Y612.122

The Downstream of Biotechnology

生物工程下游技术

——细胞培养、分离纯化、分析检测

主　编　刘国诠
副主编　陈因良　苏天升
　　张玉奎　夏其昌　耿信笃

化学工业出版社

序

生物技术必须实现产业化才能给人民造福，取得应有的社会和经济效益。根据国际上发展生物技术的经验和资料可以得知，在医学生物高技术领域中，下游技术在生物技术产品成本中所占的比例极大，我国发展生物高技术的实践也证明了这一点。可以说，下游技术是生物高技术实现产业化的关键。

生物工程的下游技术并没有明确的定义。在我国，它泛指从工程菌或工程细胞的大规模培养一直到产品的分离纯化、质量监测所需要的一系列单元操作技术。其中，产品的分离纯化是其最重要的组成部分。

在国家的“863”技术和科技攻关计划的支持和推动下，伴随着我国生物高技术的蓬勃发展，我国的生物工程下游技术也从无到有地建立和发展了起来。下游技术的一些重要环节，如动物细胞的大规模培养、分离纯化技术及产品的质量控制与分析等，均已开展了相应的研究工作并取得了可喜的成果。动物细胞培养用微载体、分离纯化用特种膜及器件、分离纯化专用介质的主要品种等，均已研制成功并正开展中试或已组织小规模的生产。一个符合我国国情的初步配套的生物工程下游技术的研究、开发体系正在形成，它必将对我国生物高技术实现产业化发挥出应有的作用。

为了促进我国生物工程下游技术的发展，“863”生物技术专家委员会委托第二主题专家组于1992年5月在西安召开了下游技术研讨会。会上，邀请了活跃在下游技术研究工作第一线的专家、学者作了中心发言，就下游技术发展的现状、趋势及特点进行了交流和讨论。本书就是根据西安研讨会的主要内容加以修改、补充后编写的。

本书系统而详尽地介绍了用于生物工程下游的一些关键技术，如生物反应器、大规模细胞培养、动物细胞培养用微载体与微囊化培养方法、破菌技术与设备、有机与无机分离、纯化介质、膜分离介质与器件、蛋白质的制备色谱分离技术与方法、生物工程产品的质量监控与分析检测方法等。本书各章既独立成章又互相呼应；既着力于发展现状和趋势的讨论，又兼顾了基础知识与背景的阐述。为使读者对生物工程下游技术有一个全面的了解，本书十分重视对原理和实际使用技术的介绍，再加上详尽的图表、资料和参考文献，使本书兼具了工具书的作用。

由于作者们在各自的专业领域中有着丰富的经验和深厚的积累，使得他们对所涉及的论题能驾御自如、游刃有余，他们对下游技术的各个关键环节都有中肯的评述和独到的见解。我相信，这本书对从事于生物工程下游技术研究、教学和生产等方面的广大同仁，定会有所助益。

顾健人*

1993年7月

---

* 上海市肿瘤研究所的顾健人教授是“863”生物技术领域第二主题专家组组长。

目　录

序
第一篇　生物反应器及大规模细胞培养 …… 1
第一章　生物反应器 …… 1
（曹竹安，清华大学）
第一节　概述 …… 1
第二节　细胞生长及代谢过程动力学 …… 2
一、细胞生长的特点、描述方法的分类 …… 2
二、均衡生长模型 …… 3
1. 细胞生长模型 …… 3
2. 基质消耗的模型 …… 4
3. 产物生成动力学模型 …… 5
三、其它模型 …… 6
第三节　生物反应器的基本类型 …… 8
一、生物反应器的特点及分类 …… 8
二、批式反应器 …… 12
三、连续搅拌罐反应器——恒化器 …… 15
第四节　生物反应器的放大 …… 17
一、概述 …… 17
1. 氧的供给 …… 17
2. 罐内流体的混合 …… 19
二、搅拌及传氧 …… 20
1. 搅拌 …… 20
2. 氧的传递 …… 22
三、生物反应器的放大原则 …… 23
1. 几何相似 …… 23
2. 恒定等体积功率放大 …… 23
3. 恒定传氧系数 k_La 放大 …… 23
4. 恒定剪切力-恒定叶端速度（πnd_i）放大 …… 23
5. 恒定的混合时间 T_m 放大 …… 23
第五节　生物反应器的控制及优化 …… 24
一、生物反应器的控制 …… 24
二、生物培养过程的优化 …… 28
1. 过程变量的关联及敏感量（变量或参数）的获得 …… 28
2. 流加技术的应用 …… 28
符号表 …… 30
参考文献 …… 30
第二章　动物细胞大规模培养和专用生物反应器 …… 31

（张元兴　陈志宏　陈因良，华东化工学院生化工程研究所）
第一节　常用的培养方法 …… 31
一、贴壁培养 …… 31
二、悬浮培养 …… 32
三、固定化培养 …… 32
1. 吸附 …… 32
2. 共价贴附 …… 32
3. 离子/共价交联 …… 32
4. 微囊 …… 32
5. 包埋 …… 33
第二节　动物细胞培养的操作方式 …… 33
一、分批式操作 …… 33
二、流加式操作 …… 34
三、半连续式操作 …… 34
四、连续操作 …… 34
五、灌注培养 …… 35
第三节　细胞培养过程的放大 …… 36
一、培养基组成 …… 36
二、限制细胞生长的因素 …… 37
三、污染的控制 …… 37
四、产物表达的控制 …… 37
五、硬件和过程设计参数 …… 38
六、产物收获 …… 38
第四节　动物细胞培养生物反应器 …… 39
一、生物反应器的种类 …… 39
1. 悬浮培养用 …… 39
2. 贴壁培养用 …… 39
3. 包埋培养用 …… 40
二、气升式细胞培养生物反应器 …… 40
三、中空纤维管生物反应器 …… 41
四、通气搅拌生物反应器 …… 42
五、无泡搅拌反应器 …… 43
六、动物细胞反应器的控制 …… 44
参考文献 …… 45
第三章　细胞培养专用微载体 …… 47
（李雨田　陈因良　丁健椿，华东化工学院生化工程研究所）
第一节　采用微载体培养贴壁细胞是当前最有发展前途的一种培养模式 …… 47
第二节　动物细胞在微载体上贴壁生长机理 …… 48
第三节　优良的微载体应具有的特性 …… 49

第四节 国外微载体研制现状及发展趋势 …… 49
一、交联葡聚糖为基质的微载体 …… 49
1. DEAE -交联葡聚糖 …… 49
2. Cytodex 2 微载体 …… 50
3. Cytodex 3 微载体 …… 50
二、纤维素为基质的微载体 …… 51
三、蛋白质为基质的微载体——变性胶原微载体 …… 51
四、高分子合成材料为基质的微载体 …… 51
1. 聚苯乙烯微载体 …… 51
2. 苯乙烯-二乙烯苯共聚微载体 …… 51
3. 聚甲基丙烯酸羟乙基酯微载体 …… 51
4. 聚乙烯基吡啶微载体 …… 52
5. 聚丙烯酰胺微载体 …… 52
6. 硅橡胶微载体 …… 52
五、无机材料玻璃为基质的微载体 …… 52
1. 中空玻璃微载体 …… 52
2. 明胶涂覆的多孔微载体 …… 52
六、液膜微载体 …… 52
第五节 研制开发国产微载体的必要性 …… 53
参考文献 …… 57
第四章 动物细胞的微囊化培养 …… 58
（吉鑫松 陈国荣 朱冬发 袁中一，
中国科学院上海生物化学研究所）
第一节 动物细胞的微囊化 …… 58
一、微囊化概述 …… 58
二、动物细胞微囊化方法 …… 59
1. 聚赖氨酸/海藻酸(PLL/ALG)微囊化 …… 59
2. 其它的微囊化方法 …… 60
第二节 微囊化细胞的培养 …… 61
一、微囊化培养的细胞种类 …… 61
二、培养条件 …… 62
第三节 微囊化动物细胞的应用 …… 63
一、生产药物上的应用 …… 63
1. 单克隆抗体的生产 …… 63
2. 高值生化药物的生产 …… 63
3. 干扰素的生产 …… 63
二、在治疗及药物筛选上的应用 …… 64
1. 人工器官 …… 64
2. 抗癌药物的筛选 …… 64

参考文献 …… 64
第二篇　目标产品的分离与纯化 …… 65
第五章　细胞破碎和固液分离 …… 65
（苏志国　张华民　修志龙　姜　炜，大连理工大学化工学院）
第一节　概述 …… 65
第二节　细胞破碎 …… 65
一、细胞破碎技术的分类 …… 66
二、几种常用的破碎方法 …… 66
1. 高压匀浆法 …… 66
2. 高速珠磨法 …… 68
3. 超声破碎 …… 70
4. 化学渗透法 …… 70
5. 酶溶法 …… 72
三、细胞破碎技术研究的发展方向 …… 73
1. 多种破碎方法相结合 …… 73
2. 与上游过程相结合 …… 73
3. 与下游过程相结合 …… 74
第三节　包含体产物的分离 …… 74
第四节　离心沉降 …… 76
第五节　微孔膜过滤 …… 79
第六节　双水相萃取 …… 84
第七节　避开固液分离的探索 …… 87
一、流化床直接吸附法 …… 87
二、膜直接吸附法 …… 87
参考文献 …… 88
第六章　膜分离技术在生物工程中的应用 …… 91
（刘忠洲，中国科学院生态环境研究中心）
第一节　概述 …… 91
第二节　几种膜分离过程的定义与分离原理 …… 92
1. 微滤 …… 93
2. 超滤 …… 93
3. 反渗透 …… 94
4. 透析 …… 94
5. 电渗析 …… 94
第三节　膜结构及其分离特性 …… 94
一、微滤膜 …… 94
二、超滤膜与反渗透膜 …… 96
三、电渗析膜 …… 98
第四节　生物工程后处理过程中膜分离技术的选择与应用 …… 99

一、微生物的分离与收集…… 99
二、酶、蛋白质、抗体、多糖和一些基因工程产品的分离浓缩…… 103
1. 膜品种与膜规格的选择 …… 103
2. 浓差极化 …… 104
3. 膜污染 …… 104
4. 清洗 …… 106
三、超滤分级 …… 108
四、除水中热源 …… 108
第五节 组件结构…… 108
第六节 系统设计…… 109
第七节 超滤亲和纯化…… 113
第八节 膜反应器…… 114
第九节 电渗析与反渗透的应用…… 117
参考文献…… 118
附录 6－1 国外超滤膜生产厂家及膜性能 …… 120
附录 6－2 我国研制 MF、UF、RO 膜的单位 …… 124
附录 6－3 我国 RO、UF、MF 膜、组件、装置生产单位 …… 125
第七章 生物大分子的色谱分离和纯化…… 128
（耿信笃 马 凤，西北大学化学系现代分离科学研究室）
第一节 基本理论…… 129
第二节 装置和操作技术…… 131
第三节 色谱条件及色谱纯化工艺的最优化…… 132
第四节 应用举例…… 135
参考文献…… 140
第八章 非线性色谱原理及其在蛋白质分离与纯化中的应用…… 143
（黄骏雄，中国科学院生态环境研究中心）
第一节 概述…… 143
一、色谱法的基本特点 …… 143
1. 分离效率高 …… 143
2. 应用范围广 …… 144
3. 操作参数多 …… 144
4. 高灵敏度在线检测 …… 144
5. 快速分离 …… 144
6. 连续自动化操作 …… 144
二、线性色谱与非线性色谱 …… 145
第二节 非线性色谱理论基础…… 146
一、吸附过程及吸附等温线 …… 146
二、非线性色谱基本理论 …… 149
1. 吸附平衡热力学 …… 149

2. 吸附平衡动力学 …… 150
3. 色谱基本物料平衡方程 …… 150
第三节 非线性色谱的实验方法 …… 151
一、非线性色谱中的固定相及色谱柱 …… 151
1. 固定相 …… 151
2. 色谱柱及填充技术 …… 154
二、样品溶解与进样方法 …… 155
三、非线性色谱中3种常用的展开方式 …… 156
1. 超载洗脱 …… 157
2. 前沿分析 …… 157
3. 置换展开 …… 157
四、色谱系统的生物相容性 …… 159
第四节 非线性色谱在分离与纯化蛋白质中的应用 …… 159
参考文献 …… 164
第九章 凝胶过滤及离子交换层析介质 …… 165
（王佳兴，化学工业部晨光化工研究院成都分院）
第一节 概述 …… 165
第二节 凝胶过滤介质 …… 166
一、凝胶过滤 …… 166
二、凝胶介质应具备的条件 …… 167
三、凝胶过滤介质的种类 …… 167
1. 多糖类骨架的介质 …… 167
2. 合成大分子骨架的介质 …… 167
3. 由天然大分子与合成高聚物构成混合骨架的介质 …… 168
第三节 凝胶过滤介质的主要品种 …… 168
一、葡聚糖系 …… 168
1. 结构 …… 168
2. 性能 …… 168
3. 主要用途 …… 169
4. 衍生系 …… 169
二、琼脂糖系 …… 170
1. Bio－Gel A 系 …… 170
2. Sepharose 系 …… 170
三、聚丙烯酰胺系 …… 172
四、Sephacryl 系 …… 172
五、Superdex 系 …… 176
六、聚乙烯醇系 …… 177
七、Ultrogel 系及 Trisacryl 系 …… 178
八、Bio－Beads S－X 系 …… 179

第四节　离子交换法与离子交换剂的选择…… 179
一、离子交换法 …… 179
二、离子交换剂的选择 …… 180
1. 离子交换剂种类的选择 …… 180
2. 离子交换剂的强弱性 …… 180
3. 选择适宜工作条件，提高工作容量 …… 181
第五节　生化用离子交换剂的特点及种类…… 181
一、生化用离子交换剂的特点 …… 181
1. 亲水性及生物相容性 …… 181
2. 孔结构 …… 181
3. 电荷密度 …… 182
4. 粒度 …… 182
5. 纯度 …… 182
二、生化用离子交换剂的种类 …… 183
1. 通用型离子交换树脂 …… 183
2. 功能基种类 …… 184
3. 生化专用离子交换剂 …… 185
第六节　生化专用离子交换剂品种…… 185
一、纤维素类 …… 185
二、葡聚糖系 Sephadex 离子交换剂 …… 185
三、琼脂糖系离子交换剂 …… 187
1. Bio－Gel A 系离子交换剂 …… 187
2. Sepharose 系离子交换剂 …… 187
四、Toyopearl 离子交换剂 …… 188
五、Mono Beads 系离子交换剂 …… 190
六、聚丙烯酸羟乙基酯系离子交换剂 …… 190
参考文献…… 191
第十章　有机高分子基质的高效液相色谱分离柱填料…… 193
（苏天升，中国科学院化学研究所）
第一节　概述…… 193
第二节　高分子类型 HPLC 填料的特征 …… 194
第三节　高分子类型 HPLC 填料的制备 …… 194
一、HPLC 技术对于填料的一般要求 …… 194
二、高分子基质微球的合成 …… 194
三、基质微球的化学改性 …… 195
第四节　填料性能的评价…… 196
一、填料物化性质的表征 …… 196
二、填料色谱性能的表征 …… 196
1. 保留值 …… 196

2. 选择性 …… 196
3. 柱效率 …… 197
4. 填充柱的总孔隙度和穿透性 …… 197
5. 分离度 …… 197
第五节 高分子类型的吸附分配 HPLC 填料 …… 197
一、高效反相色谱填料 …… 197
二、高效正相色谱填料 …… 200
三、高效疏水性相互作用色谱填料 …… 200
第六节 高分子类型离子交换 HPLC 填料 …… 201
一、高效离子交换色谱填料 …… 201
二、高效离子色谱填料 …… 205
第七节 高分子类型空间排除 HPLC 填料 …… 207
一、SEC 填料的一般特征与色谱指标 …… 207
1. 排除极限 …… 207
2. 分离范围 …… 207
3. 固流相比 …… 207
二、高效凝胶渗透色谱填料 …… 208
三、高效凝胶过滤色谱填料 …… 209
第八节 高分子类型高效亲和色谱填料 …… 211
参考文献 …… 212
第十一章 无机基质分离介质 …… 215
（刘国诠，中国科学院化学研究所）
第一节 无机基质 …… 215
一、硅胶 …… 215
1. 硅胶的化学性质 …… 215
2. 硅胶的物理性质 …… 216
3. 多孔硅胶的制法 …… 217
二、可控孔径玻璃 …… 218
三、其它 …… 219
第二节 硅胶的化学修饰 …… 219
一、通过表面硅羟基的化学修饰 …… 220
1. 通过氯化反应 …… 220
2. 通过氯硅烷与硅羟基的反应 …… 220
3. 通过烷氧基硅烷与硅羟基的反应 …… 220
二、通过涂层改进硅胶的表面性质 …… 221
三、整体修饰 …… 221
四、硅烷化试剂 …… 221
第三节 反相介质 …… 223
一、反相介质的合成 …… 223

二、反相介质的表征与评价 …… 224
1. 配基键合密度与残余硅羟基浓度 …… 224
2. 键合相结构与色谱性能的关系 …… 225
三、常见的反相介质 …… 226
第四节 高效亲水凝胶介质 …… 228
一、对高效亲水凝胶介质的要求 …… 228
二、表面亲水层的键合 …… 228
三、常见的无机亲水凝胶介质 …… 228
第五节 高效离子交换色谱介质 …… 229
一、薄壳型离子交换介质 …… 230
二、全多孔硅胶型离子交换介质 …… 230
第六节 高效亲和色谱介质 …… 232
一、高效亲和色谱的特点 …… 233
二、用于高效亲和色谱的基质 …… 233
三、硅胶的活化 …… 234
四、一些商品化的高效亲和介质 …… 235
第七节 高效疏水作用介质 …… 237
综合参考文献 …… 237
参考文献 …… 237
第十二章 羟基磷灰石分离介质 …… 240
（余贤真 周纯益，中国科学院化工冶金研究所）
第一节 发展概况 …… 240
第二节 HPLC 柱对介质的要求及羟基磷灰石的性能 …… 241
一、高机械强度 …… 241
二、粒子大小、形状和孔隙 …… 241
三、化学和热稳定性 …… 241
四、非可逆性吸附 …… 241
五、表面化学修饰 …… 242
第三节 羟基磷灰石的制备方法 …… 242
一、Tiselius 型羟基磷灰石的制备方法 …… 242
二、日本制备羟基磷灰石的方法 …… 243
三、制备球形羟基磷灰石的新方法 …… 243
1. 球形复合羟基磷灰石 …… 243
2. 均相法球形羟基磷灰石 …… 243
第四节 羟基磷灰石的商品化情况 …… 244
第五节 羟基磷灰石柱色谱机理的研究 …… 247
一、实验 …… 247
二、假定、推论和结论 …… 247
第六节 羟基磷灰石在生物大分子分离纯化中的应用 …… 250

一、一般应用领域 …… 250
二、单克隆抗体的分离纯化 …… 250
三、结构差异很小的蛋白质分离 …… 251
四、有机溶剂体系中的羟基磷灰石 HPLC …… 251
参考文献 …… 251
第十三章　径向色谱柱的发展与应用 …… 260
（张玉奎　李　彤，中国科学院大连化学物理研究所
姚志建　徐明波，军事医学科学院基础医学研究所）
第一节　概述 …… 260
第二节　径向色谱柱结构 …… 261
第三节　径向色谱柱填料 …… 262
第四节　径向色谱柱的应用 …… 263
一、血液制品 …… 264
二、生物样品 …… 266
三、基因工程产品 …… 268
参考文献 …… 269
第十四章　电泳分离技术 …… 270
（孙万儒，中国科学院微生物研究所）
第一节　概述 …… 270
第二节　电泳技术原理 …… 270
第三节　电泳的技术问题和对策 …… 272
第四节　在生物技术研究上应用的电泳技术 …… 274
1. 新的电泳载体 …… 274
2. 显色技术 …… 274
3. 电泳仪及相关设备和材料 …… 274
第五节　生物技术产品分离纯化上应用的电泳技术 …… 274
一、平板电泳 …… 274
1. 水平平板电泳 …… 275
2. 垂直平板电泳 …… 276
二、连续凝胶电泳 …… 276
三、等电聚焦电泳 …… 277
1. 螺旋管等电聚焦电泳 …… 278
2. 水平旋转等电聚焦电泳 …… 278
四、连续流动电泳 …… 280
五、无载体连续流动电泳 …… 281
参考文献 …… 284
第三篇　目标产品的分析检测及质量控制 …… 285
第十五章　目标产品的蛋白质分析检测技术与质量控制 …… 285
（夏其昌，中国科学院上海生物化学研究所）

第一节　蛋白质的纯度…… 285
第二节　氨基酸分析…… 286
第三节　蛋白质浓度测定和分子量的测定…… 287
第四节　肽谱…… 288
一、裂解方法 …… 288
二、肽谱分析 …… 289
三、两种新技术 …… 290
1. 微柱 HPLC …… 290
2. 毛细管电泳 …… 291
第五节　蛋白质一级结构和突变点的分析…… 291
第六节　蛋白质的二硫键分析…… 292
第七节　蛋白质化学分析技术及新发展…… 293
第八节　其它…… 294
参考文献…… 295

第一篇　生物反应器及大规模细胞培养

第一章　生物反应器

曹竹安

（清华大学，北京，100084）

第一节　概　述

各种细胞及其代谢产物的生产过程都要通过细胞的培养，而细胞培养所用的装置就是反应器。在实验室培养用的方瓶、锥形瓶是反应器，扩大所用的各种发酵装置也是反应器，就连菌种保存用的琼脂斜面在培养阶段也是反应器。

细胞的生长、繁殖、代谢作用都是细胞对客观环境的响应，与鸡蛋在合适的条件下孵化为小鸡是一样的。生物反应器的作用就是要为细胞代谢提供一个优化的物理及化学环境，使细胞能更快更好地生长，得到更多的需要的生物量或代谢产物。

有了好的细胞株，良好的培养环境就是决定的因素了。细胞生长需要的条件是：

（1）　良好的物理环境。最主要的有温度、pH 值、溶氧量、合适的混合强度以保证细胞与营养物的接触及细胞的悬浮等。

（2）　合适的化学环境。要求有适宜的各种营养物的浓度，并限制各种妨碍生长代谢的有害物质的浓度。

研究生物反应器的目的，一是要确定为达到一定的生产目的需要多大的生物反应器，什么样的结构更好；二是对已有的生物反应器进行分析，达到优化的目的；三是分析各种生物反应器的数据，从而对细胞的生长、代谢等过程有更深入的理解。

由上所述可以知道，生物反应器是工程学的一个部分，而工程学的最重要的特点就是要定量地进行研究。下面各节的讨论多从定量的角度进行分析。

此外生物反应器又是化学工程的一个分支，在反应器的分析方面要用到较多的化学工程的基础知识。其中除了化学反应工程要在下面较详细的介绍以外（结合生物化学反应工程），化学工程还包括下面几个重要的内容。

（1）　流体的输送及混合。其核心问题是流体之间动量的传递、机械能的转化。

（2）　热量的传递。对于生物反应器要考虑发酵热的传出以及发酵罐温度的控制。所用的手段多采用间壁的传热。其传热量大小决定于冷热两流体的温度差及其接触面积的大小。

（3）　物质的传递。在生物反应器内进行着各种物质传递过程，如细胞内外物质的交换、营养物到细胞的传递、氧从气泡到细胞的传递、二氧化碳从细胞到气泡的传出。这些传递过程的强度主要由浓度差以及扩散（传递）的面积决定。

对生物反应器进行定量研究的基础是生物反应动力学。

第二节　细胞生长及代谢过程动力学

一、细胞生长的特点、描述方法的分类

动力学研究的目的是要定量地描述过程的速率以及影响过程速率的诸因素。生物过程动力学研究的主要问题是生物反应的速率，特别是细胞生长的速率、各种基质组分消耗的速率、代谢产物的生成速率。

(1) **反应速率**　单位时间物质浓度的变化量。如细胞的生长速率可表示为 $\mathrm{d}x/\mathrm{d}t$，其中 x 为细胞浓度(g/L)，t 为时间(h)；代谢产物的生成速率为 $\mathrm{d}p/\mathrm{d}t$，基质的消耗速率为 $-\mathrm{d}s/\mathrm{d}t$，其中 p 及 s 分别为产物和基质(碳源、氮源等)的浓度。

(2) **得率系数**　两种物质得失之间的计量比。如菌体生成量(生物量)对基质消耗量的得率系数 $Y_{x/s}=-\mathrm{d}x/\mathrm{d}s$，而产物生成量对基质消耗量的得率系数 $Y_{p/s}$ 为 $-\mathrm{d}p/\mathrm{d}s$；……。特别值得一提的有两点：一是上面定义式给的是微分量的关系，即得率系数可能随着生物培养进程有变化，其原因主要是代谢途径有所变化。对于较简单的过程有时得率系数随时间变化不大，也可以把得率系数表示为变化总量之间的关系，如 $Y_{x/s}=-\Delta x/\Delta s$；第二点是在分析代谢过程时常用一个特殊的得率系数——呼吸商，它是释放出二氧化碳的摩尔数与消耗氧的摩尔数之比。

(3) **比速率**　是单位质量的菌体单位时间引起某物质浓度的变化量。如菌体的比生长速率 $\mu=\dfrac{1}{x}\dfrac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t}$，基质的比消耗速率 $q_s=-\dfrac{1}{x}\dfrac{\mathrm{d}s}{\mathrm{d}t}$，产物的比生成速率 $q_p=\dfrac{1}{x}\dfrac{\mathrm{d}p}{\mathrm{d}t}$。在作动力学分析时比速率的概念是很重要的，它表示菌体活力的大小，能力的大小。

(4) **理想流动与非理想流动**　前已说过动力学讨论的是生物反应速率与各环境因素之间的关系，在研究中我们希望确切知道在生物反应器内各点环境因素的值。但实际生物反应器尤其是较大的生物反应器由于混合、传热等需要时间，其内部往往不是均一的，给研究造成困难，也给反应器的放大造成困难。在研究小型反应器时根据其流动特点分为两种理想流动模式：一是全混式，即反应器内各点浓度及其它条件均一；二是活塞流式，即反应器内物质沿一定方向流动，完全没有反向混合。讨论反应动力学时常常假定生物反应是在全混的状态下进行的。而实际反应装置因其流动特点常常介于上述两种理想流动之间，讨论及计算比较复杂。

生物反应过程的核心问题是细胞的生长。

细胞的生长(繁殖)、代谢是一个复杂的生物化学过程，既包括有各种细胞内的生化反应、胞内与胞外的物质交换，也包含有胞外的物质传递及生化反应。与一般化学工程不同，这个反应体系的特点是多相、多组分、非线性的体系。多相指的是体系内常含有气相、液相以及菌体(固)相，而各相状态及物理性质不同，相内的反应及传递各有特点，相间还有复杂的相互作用。多组分反映的是在培养液内有各种营养成份，也有代谢排出的各种产物，在胞内更有具有不同生理功能的大、中、小分子化合物。非线性指的是细胞的代谢过程通常不能用线性方程或方程组来描述，即使简化模型中的参数也常具有时变性。

除了上述特点以外，细胞的培养和代谢还是一个复杂的群体的生命活动，通常每毫升培养液中含 $10^4\sim10^8$ 个细胞，而且象任何有生命的东西一样，细胞都经历着新生、成长、成熟直至衰老的过程，在其生命的循环中也存在着退化与变异的问题。

因此，要对这样一个复杂的体系进行精确的描述几乎是不可能的，而且为了工程的目的也不必要过分细致。在进行定量的描述之前，首先要进行合理的简化。在简化假设的基础上建立起过程的物理模型，再据此推出数学模型。

通常对细胞群体所进行的简化假设，主要有两方面：

(1) 是否考虑细胞内部复杂的结构？

(2) 是否考虑细胞之间的差别？

根据上述两方面的考虑，对细胞群体可以有图 1－1 所示 4 种模型。

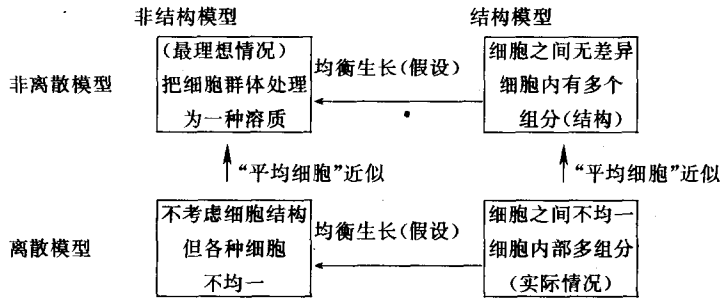


图 1－1 对细胞群体的描述模型

图 1－1 右上角的模型是非离散的结构模型，文献上简称结构模型。这种模型把细胞分为具有不同生理功能的组分，各组分相互配合、相互转化完成了整个细胞的生长、繁殖及代谢。这种模型考虑到胞内不同的结构单元，对更精细地分析细胞的代谢调控是很重要的，其分析结果对于过程的优化往往具有指导作用，而在工程菌培养过程中对外源基因表达的分析更需要用这种模型。结构模型考虑了胞内各结构单元的代谢及相互作用，因此列出的方程参数多、复杂，不容易解，即使用计算机求解也要花费相当的时间，因此在过程控制中较少用这种模型。

图 1－1 中左下角的模型是离散型非结构模型。它是把细胞分为几种不同形态或功能的类别。总的细胞量是各类细胞量的和，各类细胞有不同的生理功能。对于培养中细胞有明显差异(形态、功能)的过程用此种离散模型是好的，这种模型也有一个缺点，即分别测出各类细胞量是有困难的。

图 1－1 右下角的模型描述的是细胞培养的实际情况，但在求解及分析中也是最繁杂的，因此应用较少。

上述 3 种模型在实际过程分析中应用较少，本章不作详细讨论。

在工程上应用最多的是图 1－1 中左上角非结构非离散模型，通常简称为均衡生长模型。由于这种模型没有考虑细胞内部的结构(组分)，又不考虑各种细胞之间有任何差异，因此可以把细胞用"浓度"这一个量来描述，即把细胞看成一种"溶质"，从而简化了胞内外的传递过程分析，也简化了过程的数学描述。对于相当多的微生物过程分析，特别是过程控制来说，均衡生长模型是可以满足要求的。

二、均衡生长模型

1. 细胞生长模型

均衡生长模型只用一个量来描述细胞的量，即生物量或细胞的浓度。通常用每毫升培养液

中菌体个数或干菌重来描述。

描述细胞生长速率的一个重要参数是比生长速率 μ，它的定义是

$$\mu=\frac{1}{x}\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} \tag{1-1}$$

式中 x 为细胞浓度；t 为时间。

因此，比生长速率表示在单位体积内单位量细胞经过单位时间增加的细胞量。这种增加包括生长和繁殖两个部分。比生长速率的单位是时间的倒数，即 h^{-1}、min^{-1}或 s^{-1}。

如在一段培养过程中比生长速率不变，则(1－1)式积分得到菌量的变化为：

$$x=x_0\exp(\mu t) \tag{1-2}$$

式中 x_0 为 $t=0$ 时的菌量。

由(1－2)式也可以计算在一段均衡生长过程中的比生长速率：

$$\mu=\frac{1}{t}\ln\frac{x}{x_0} \tag{1-3}$$

比生长速率表示了菌体增长的能力，它也受菌株及各种物理化学环境因素的影响，在菌株决定后环境因素中研究的最多的是限制性底物的影响，最常用的定量表达式为 Monod 方程：

$$\mu=\mu_m\frac{S}{K_s+S} \tag{1-4}$$

μ_m 为最大比生长速率；K_s 为饱和系数又叫 Monod 常数。在很多情况下用 Monod 方程关联基质浓度 S 与比生长速率 μ 的关系都得到了满意的结果。对于比较粘稠的发酵液，由于菌体对基质的扩散阻力，Monod 方程有偏差，常可用 Contois 式表示：

$$\mu=\mu_m\frac{S}{K_xx+S} \tag{1-5}$$

式中 K_x 是比例系数。

对于高密度培养，特别是丝状菌培养过程，应用上式常得到满意的结果。

其它还有几个常用的关联式：

对于基质抑制的情况 Andrews 提出

$$\mu=\mu_m\frac{S}{K_i+S+S^2/K_p} \tag{1-6}$$

式中 K_i 表示有抑制作用时的饱和系数；K_p 是反映抑制作用的比例系数。

对于产物抑制的情况 Aiba 提出

$$\mu=\frac{\mu_mS}{K_i+S}\cdot\frac{K_p}{K_p+P} \tag{1-7}$$

对于限制底物多于一种的情况

$$\mu=\mu_m\frac{S_1}{K_1+S_1}\cdot\frac{S_2}{K_2+S_2}\cdot\cdots \tag{1-8}$$

式中 S_1、S_2 表示基质中不同的组分浓度；K_1、K_2 为相应的饱和系数。

当然菌体的生长还要受许多物理因素的影响，例如，温度、pH 值等。目前多把这些因素控制在最佳值。这样适当选择式(1－4)～(1－8)就可以定量地描述菌体的生长了。

2. 基质消耗的模型

基质包括细胞生长所需各种营养成分，其消耗主要有 3 个方面：一是细胞的生长，合成新

的细胞；二是细胞维持生命要消耗能源物质；三是合成次级代谢产物。这样可以建立基质消耗的数学模型是

$$\frac{ds}{dt}=-\frac{1}{Y_{x/s}}\frac{dx}{dt}-m_x x-\frac{1}{Y_{p/s}}\frac{dp}{dt} \tag{1-9}$$

式(1－9)右边各项依次表示菌体生长、维持及次级代谢所消耗基质的速率。这里所说的基质包括碳源、氮源、氧及其它营养源。式中 $Y_{x/s}$、$Y_{p/s}$ 分别表示菌量对基质、产物对基质的得率系数；m_x 为菌体的维持系数，表示单位量菌体在单位时间所消耗的基质量，通常主要限于产生能量的碳源及氧的代谢。

3. 产物生成动力学模型

产物主要指的是细胞培养过程中代谢生成的除细胞量以外的产品。按照其生成特点产物的生成可分为两类：生长耦联型及非生长耦联型。这两者之区别在于前者的生成只是在细胞生长时才能生成，而后者则只要有细胞存在就会生成。至于具体代谢产物究竟是哪种类型的还要从代谢动力学作深入的分析。通常把抗生素或生物毒素看作是非生长耦联型的，也有些产物可以叫混合生长耦联型，即既与生长有关也与菌量有关，产物生成的通用模型是

$$\frac{dp}{dt}=\alpha\frac{dx}{dt}+\beta x \tag{1-10}$$

式中 α、β 是与生长及菌体有关的比例系数，与前面 Monod 常数一样，它们也受菌株及各种环境因素的影响。在对代谢途径作了一番研究以后可以列出相应的表达式表示 α、β 与环境因素的关系，从而对式(1－10)求解。

实际在生物培养过程中菌体的生长、基质的消耗及产物的生成三方面是交织在一起的：菌体的生长消耗了基质，而基质浓度的变化又影响菌体的生长速度，对于产物也是这样。因此细胞培养整体的动力学模型是上述几个微分方程联立的结果。已知初始条件即可以应用合适的数学方法对过程求解及分析。

下面以青霉素球状菌发酵动力学为例来说明均衡生长动力学的应用。图 1－2 给出了青霉素发酵过程代谢曲线。这是一个中间有补料的批式培养过程，可补的料有碳源——糖液、氮源——尿素溶液和青霉素发酵的前体——苯醋酸。为了研究菌体的生长、前体的消耗、产物的生成、基质的消耗，为过程的控制提供信息，拟采用尽量简化的模型，通过代谢曲线的分析及菌体形态的观察提出如下的假设。

(1) 菌体均衡生长，用单一参数生物量来描述菌体。

(2) 发酵中菌体呈丝状，浓度较大，最高达 40g/L，因此采用 Contois 方程来关联比生长速率，即

$$\mu=\mu_m S/(K_x x+S) \tag{1E-1}$$

(3) 在发酵过程中菌丝缠绕成球，菌球直径为 50～300μm，球内基质浓度受到扩散阻碍，因此用基质的有效浓度 s 来代替发酵液中浓度 S，即

$$s=S-K_i x \tag{1E-2}$$

(4) 青霉素的合成受到糖的非竞争性抑制作用。

(5) 在合适的条件下氮源、溶氧均不是限制性基质。

基于上述假设(亦即物理模型)可以建立数学模型。

$$\frac{dx}{dt}=\frac{\mu_x s x}{K_x x+s}-\frac{x}{V}\cdot\frac{dV}{dt} \tag{1E-3}$$

$$\frac{dS}{dt}=-\frac{1}{Y_{x/s}}\frac{\mu_x sx}{K_x x+S}-\frac{1}{Y_{p/s}}\frac{\mu_p sx}{K_p+s+s^2/K_i}-m_x x+\frac{F_s}{V}-\frac{S}{V}\frac{dV}{dt} \tag{1E-4}$$

$$\frac{dP}{dt}=\frac{\mu_p sx}{K_p+s+s^2/K_i}-K_h P-\frac{P}{V}\frac{dV}{dt} \tag{1E-5}$$

$$\frac{dV}{dt}=f(t) \tag{1E-6}$$

上式中 V 表示发酵的体积，因此各式中最后一项表示由于流加物料导致体积变化而引起的各组分的“稀释”作用；F_s 表示糖(碳源)的流加速率；μ_p 为产物生成的比速率；K_i 为抑制常数；K_h 为水解速率常数。用多批实验数据，采用非线性回归方法得到上述数学模型中各参数值为：

	μ_x	K_x	μ_p	K_p	K_i	K_h	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	m_x
单位	h^{-1}	—	h^{-1}	g/L	g/L	h^{-1}	—	—	h^{-1}
值	0.108	0.662	0.138	0.148	0.438	0.0473	0.528	0.725	0.0146

用上述参数值，与发酵初始条件、流加条件可以计算得到过程曲线(图 1－2)。

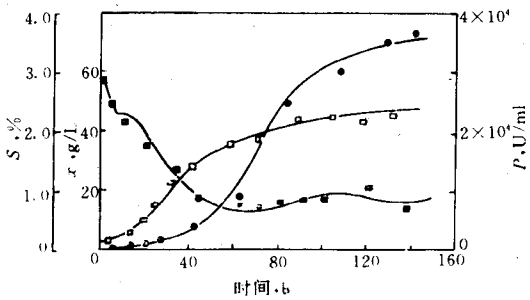


图 1－2　青霉素发酵过程曲线
□—X；■—S；●—P

由图可以看出计算曲线与实验点是符合的，用统计方法分析了 6 组试验 91 个数据，相对偏差仅 4.6%，说明上述模型是合适的。

三、其它模型

上面介绍的均衡生长模型把细胞看成一个“溶质”，没有考虑胞内的结构和细胞之间的差别。在分析胞内诱导作用、对基因工程菌进行动力学描述以及细胞形态及功能有较大差异时应用上述模型是不力的。离散模型和结构模型解决了这些困难。由于考虑问题的重点不同，文献中所建立的模型是很多的。下面以一个形态结构动力学模型实例来说明考虑问题的方法。

头孢霉素 C(简称 CPC)是一种抗生素，它是由一种霉菌 *Cephalosporium acremonium* 发酵得到的代谢产物。研究发酵的代谢曲线并观察菌体的形态得到如下假设。

(1)　菌体具有 3 种形态：菌丝(h)、膨胀的菌丝(s)和节孢子(a)，3 种形态依次转化。

(2)　CPC 主要由膨胀的菌丝形态产生。

(3)　CPC 合成酶是一种诱导酶，它受胞内蛋氨酸(Met)的诱导，受胞内葡萄糖的阻遏。

(4)　基质(碳源及氮)主要被菌丝及膨胀的菌丝两种形态所利用。

上述假设可以用图 1－3 描述。

根据这一物理模型可以建立如式(1E－7)到式(1E－22)的数学模型。其中式(1E－7)～(1E－11)描述菌体的生长及分化，式(1E－12)～(1E－14)主要描述葡萄糖和蛋氨酸的利用，式(1E－15)～(1E－19)描述胞内蛋氨酸的代谢，式(1E－20)、(1E－21)描述酶的合成，式(1E－22)描述产物 CPC 的生成。

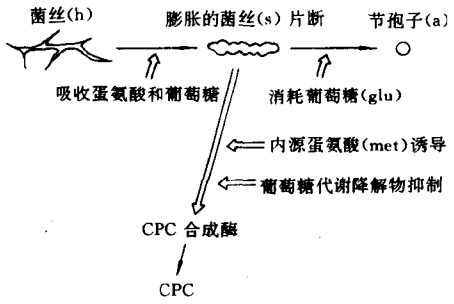


图 1－3　头孢霉素 C(CPC)发酵过程菌体形态变换及头孢霉素 C 的产生过程

$$\frac{dx_h}{dt}=\frac{\mu_m g}{K_g+g}x_h-\beta(g,m)x_h-k_D x_h \tag{1E-7}$$

$$\frac{dx_s}{dt}=\beta(g,m)x_h-\gamma(g)x_s-k_D x_s \tag{1E-8}$$

$$\frac{dx_a}{dt}=\gamma(g)x_s-k_D x_a \tag{1E-9}$$

$$\beta(g,m)=\left(k_{11}+\frac{k_{12}m}{K_m+m}\right)\left(\frac{g}{K_G+g}\right) \tag{1E-10}$$

$$\gamma(g)=k_{21}+k_{22}\left(\frac{g}{k_g+g}\right) \tag{1E-11}$$

$$\frac{dg}{dt}=-\frac{\mu_m g x_h}{Y_{H/G}(g+K_g)}-\frac{\gamma_m g x_s}{g+K_g} \tag{1E-12}$$

$$\frac{dm}{dt}=-U_h x_h-U_s x_s \tag{1E-13}$$

$$U_h=\frac{U_{mh}m}{m+K_m}\qquad U_s=\frac{U_{ms}m}{m+K_m} \tag{1E-14}$$

$$\frac{dm_{ih}}{dt}=U_h+V_{h,syn}^{max}-k_{3h}m_{ih}-\frac{V_{h,util}^{max}g}{K_g+g}m_{ih}-\frac{\mu_m g}{K_g+g}m_{ih} \tag{1E-15}$$

$$\frac{dm_{is}}{dt}=U_s+V_{s,syn}^{max}-k_{3s}m_{is}-\frac{V_{s,util}^{max}g}{K_s+g}m_{is}+\frac{\beta(g,m)x_h}{x_s}(m_{ih}-m_{is}) \tag{1E-16}$$

$$\frac{dm_{ia}}{dt}=-k_{3a}m_{ia}+\frac{\gamma(g)x_s}{x_a}(m_{is}-m_{ia}) \tag{1E-17}$$

$$\frac{de}{dt}=\frac{1}{x_s}\left(\frac{V_{mE}m_{is}x_s}{m_{is}+K_E}\right)_{t-t_l}\cdot Q-(k_{ED}+\beta(g,m)\frac{x_h}{x_s})\cdot e \tag{1E-18}$$

$$Q=\frac{1+(\kappa/a^*)g}{1+(\kappa/a^*)(1+\eta)g^*} \tag{1E-19}$$

$$\overline{m_i}=\frac{x_h m_{ih}+x_s m_{is}+x_a m_{ia}}{x} \tag{1E-20}$$

$$x=x_h+x_s+x_a \tag{1E-21}$$

$$\frac{dP}{dt}=ex_s-k_{PD}P \tag{1E-22}$$

式中 μ 为比生长速率；U 为比消耗速率；k 为速率常数；K 为常数；下标 D 表示菌体死亡；e 表示 CPC 合成酶活性。

上面 14 个微分方程中所包含的 28 个参数，按方程所描述的对象分为 3 组：第一组式(1E－7)～(1E－14)，描述细胞代谢的宏观过程；第二组式(1E－15)～(1E－19)，描述胞内蛋氨酸

的代谢；余为第三组，描述 CPC 酶及产物的生成。用实验值及单纯形法优化得到如表 1－1 所给的各参数值。

表 1－1　头孢 C 产生模型中的参数值

第一组	第二组	第三组
μ_m 0.069(h^{-1})	$V_{h,syn}^{max}$ 8.7(μmol 蛋氨酸/(g 细胞·h))	V_{mE} 1.2(mgCPC/(g 细胞·h^3))
Y_G 0.45(g 细胞/g 葡萄糖)	k_{3h} 7.1(h^{-1})	K_g 12.0(μmol 蛋氨酸/g 细胞)
K_G 0.05(g 葡萄糖/L)	$V_{h,util}^{max}$ 48.6(h^{-1})	t_l 13.0(h)
k_{11} 0.015(h^{-1})	$V_{s,syn}^{max}$ 6.6(μmol 蛋氨酸/(g 细胞·h))	κ 0.29(—)
k_{12} 0.024(h^{-1})	k_{3s} 1.4(h^{-1})	a 0.15(—)
k_{21} 0.004(h^{-1})	$V_{s,util}^{max}$ 2.2(h^{-1})	η 1.6(—)
k_{22} 0.028(h^{-1})	k_{3a} 7.8(h^{-1})	n 5.1(—)
K_m 0.001(g 蛋氨酸/L)		k_{ED} 0.38(h^{-1})
γ_m 0.023(g 葡萄糖/(g 细胞·h))		k_{PD} 0.012(h^{-1})
U_{mh} 0.0012(g 蛋氨酸/(g 细胞·h))		
U_{ms} 0.0098(g 蛋氨酸/(g 细胞·h))		
k_D 0.014(h^{-1})		

第一组：有关生长和基质消耗的参数[式(1E－7)～(1E－14)]

第二组：有关胞内蛋氨酸积累的参数[式(1E—15)～(1E—17)、(1E—20)、(1E—21)]

第三组：有关 CPC 合成酶及产物 CPC 生成的参数[式(1E—18)、(1E—19)、(1E—22)]

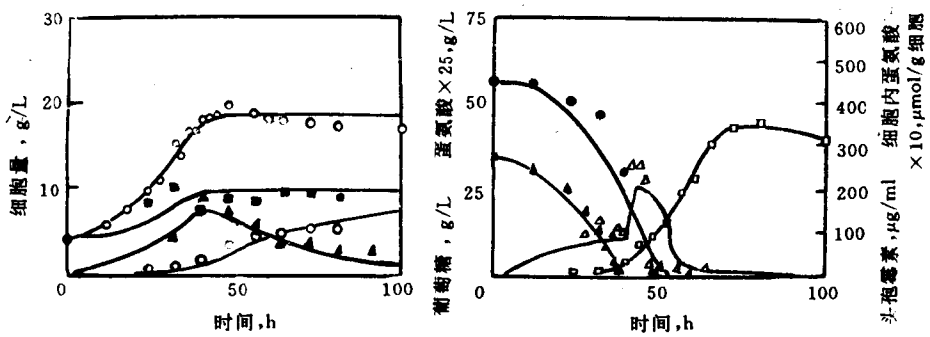


图 1－4　在批式培养中 CPC 产生的模拟曲线和实验曲线

左图：○—总细胞量；■—菌丝；▲—膨胀菌；●—节孢子

右图：●—蛋氨酸；▲—葡萄糖；△—细胞内蛋氨酸；□—头孢霉素

图 1－4 给出了按上述模型计算得到的曲线。可以看出这些曲线与实验点拟合的是很好的，特别是描述了胞内蛋氨酸出的峰值，说明模型是好的。进一步用上述模型计算分析初始葡萄糖浓度及加入蛋氨酸时间对 CPC 产量的影响，计算的结果为以后实验所证实，说明模型具有一定的可靠性。

上面的例子说明结构模型在描述胞内诱导作用方面是成功的，所得结果也有指导作用，但计算过程也的确复杂。随着计算技术的发展会出现更好的动力学模型。

第三节　生物反应器的基本类型

一、生物反应器的特点及分类

微生物的种类很多，特点各异，生物反应器也五花八门，各以不同的方式提供适宜的生长

环境，图 1－5 为一个用于青霉素发酵的大型生物反应器。青霉素的发酵是一个好氧的深层培养过程，该设备可以作为好氧生物反应器的一个典型代表，其主要组成部分为：

（1） 壳体：提供一个密封的环境，罐内外不能有泄漏以防止杂菌污染。为了高温灭菌，要求罐体设计的使用压力要达 0.3MPa 以上。

（2） 控温部分：罐上装有测温的传感器及冷却或加热用的夹套或盘管（本例用的是盘管）。

（3） 搅拌部分：主要功能是使罐内物料良好混合，从而使菌体与营养物有充分的接触。同时机械搅拌桨还有利于打碎气泡、强化传氧。本例用的是平桨涡轮，共 3 排，顶部还有一个消泡的桨叶。

（4） 通气部分：从罐的底部通入无菌空气，罐顶部有空气出口。为了克服液层的阻力并维持罐顶有适当的正压，入口空气压力常在 0.1～0.2MPa（表压）。

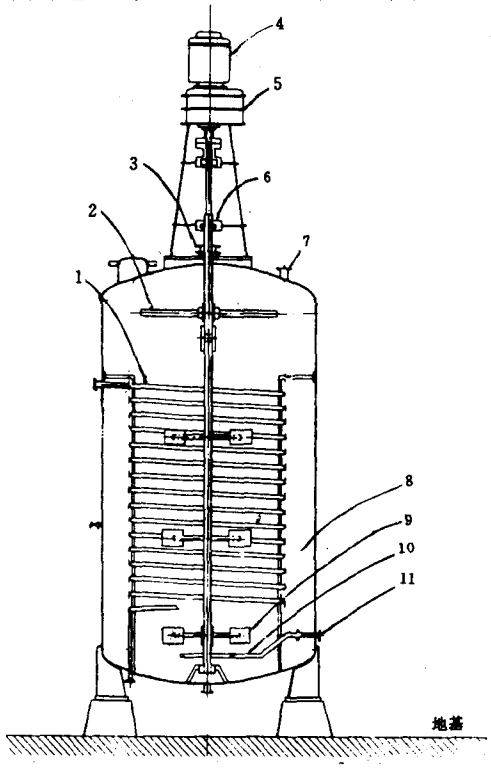


图 1－5 用于青霉素生产的 100m³ 发酵罐的剖视图

1—冷却蛇管；2—消泡桨；3—无菌密封；4—马达；5—齿轮箱；6—轴承装配；7—气体出口；8—档板；9—平桨涡轮；10—分布器；11—消毒空气入口

（5） 进料出料口（图中未明画出）：为打入发酵原料及把发酵产生液打出要设加料及出料口。此外为了操作中调 pH 值、补充营养物还设有酸碱入口及补料口等。所有这些出入口及所属管线在发酵前都要能良好灭菌，并要求有良好的密封性。

（6） 量测系统：为监测发酵过程的进行，在发酵罐上还常安装各种传感器，如 pH 值、溶氧传感器等。生物发酵体系的这些传感器也是特殊设计的，一般要承受灭菌的条件而且长时间稳定。

（7） 附属系统：在罐上常装有视镜，以观察发酵液的情况。在罐内还常装有档板以强化发酵液体的混合。

这种发酵罐根据其特点叫做机械搅拌罐，有人也叫它常规发酵罐，是目前使用最多的一

种，适用性好、适应性强，从小型到中型、到大型的细胞培养过程都可以用，放大容易。其缺点是罐内的机械搅拌剪切力容易损伤娇嫩的细胞，造成某些细胞培养过程减产。

另一种较常用的发酵装置是气体提升式发酵罐，图 1－6 为其各种常见的型式。

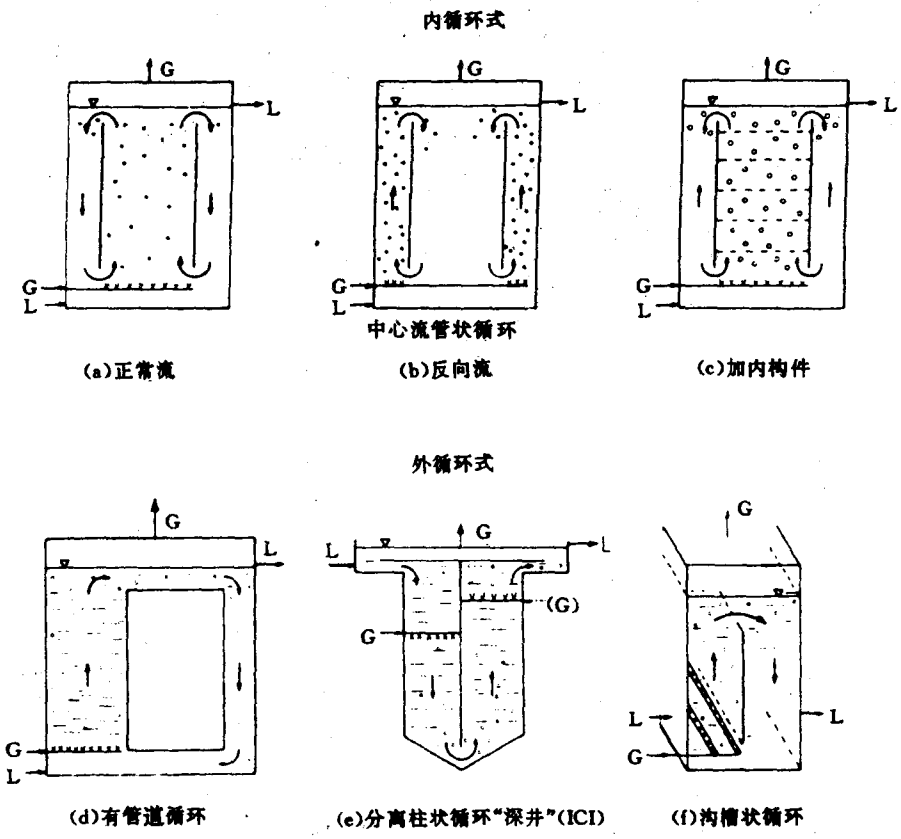


图 1－6　气体提升式发酵罐

G—气体流；　L—液体流

这种装置的特点是气体从罐下部通入，借气体的升力带动流体在整个反应器内循环流动造成良好的混合。反应器内整体混合均匀，而且因不用机械搅拌桨，减少了剪切作用对细胞的伤害。就其结构特点又分为内循环式和外循环式两大类。由于液体循环流动速度较快，因此反应器内供氧及传热都较好。但是为造成良好的混合，气升式反应器一般都需要做的较高（从十几米至几十米高），因而空气压缩机出口的压力也要高些。如果培养过程中要补入较多的营养物，而料液高度变化又较大时对反应器设计要求也是较高的，显然外循环式是很困难的。

以上两种生物反应器是目前实验室和工业上用得最多的。它们的区分主要是其结构及混合方式不同。

近年来随着生物科学的一系列新的突破，人们已开始利用动物细胞或植物细胞进行离体大规模培养，以获得大量的分泌产物。动植物细胞培养所用的生物反应器与前面所介绍的生物反应器（用于微生物细胞培养的）基本是一样的。但由于高等细胞比较娇嫩，对培养条件要求更

高一些，因而在选用及设计生物反应器时要特别考虑以下几点。

①避免或减低由于机械搅拌而产生的剪切力对细胞的损伤。

②气泡的表面张力可对细胞造成伤害，在通气时要防止气泡与细胞接触。

③在进行 pH 值调节或补料时要严格防止化学环境的急剧变化对细胞的伤害。如不能用酸碱直接加入的方式调节 pH 值，应以改变 $CO_2/O_2/N_2$ 的比例为主进行调节。

根据这样一些考虑已有悬浮培养或中空纤维细胞培养等不同类型的反应器。

值得一提的是近年来一些工程科学家提出把化工上用的固定床或流化床反应器用于细胞的培养，而且获得了很好的效果。图 1－7 为固定床动物细胞培养反应器的实例，细胞生长在大颗粒的载体内(12)，培养液在搅拌桨(5)的驱动下沿管(11)上升在顶部吸收氧气再沿颗粒床(12)下降。(8)是一个微孔(孔径只有微米级)的气体分布器它可以把空气分布得很细，象雾一样分散在营养液中，传递效率高而不会有大气泡通过细胞培养层。这个反应器已用于动物细胞的大规模培养。

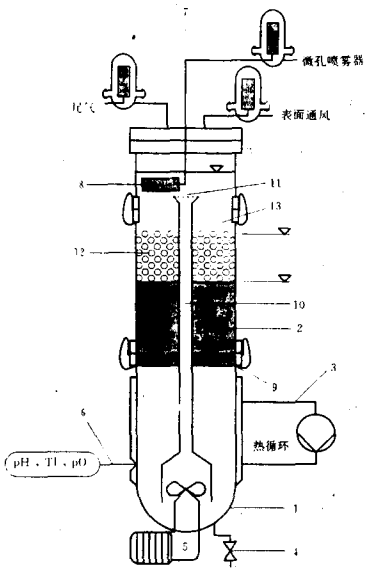


图 1－7　动物细胞培养装置

1—下筒体；2—上筒体；3—加热回路；4—取样及放料阀；5—电磁搅拌器(双向)；6—传感器接口；7—通气口；8—微孔气体分布器；9—多孔分布板；10—循环管；11—筛网；12—流化床；13—液层

生物反应器还可以按其操作方式分为下面 3 类。

(1) **批式培养**　指的是营养物和菌种一次加入进行培养，直到结束放出，中间除了空气进入和尾气排出，与外部没有物料交换。实验室内摇瓶培养就是这种过程，由此放大到罐操作也比较容易，传统的生物产品发酵多用此过程。这种过程除控温、通气以外不用太多控制，操作简单。但从细胞所处的化学环境来看，则明显改变，培养初期营养物过多可能抑制生长，培养的中后期可能又因为营养物浓度过低而降低培养效率。从细胞的增殖来说，初期细胞浓度低，增长慢，后期细胞浓度虽高，但营养物浓度过低也长不快，总的设备生产能力不是很高的。

(2) **连续培养**　批式培养是一种间歇的培养过程，每批之间有清洗、准备时间，而且每批都是在不断改变着的培养基中培养的，效率不高，各个罐批产物的质量、浓度也不尽相同，给产物的分离、纯化造成一定的困难。连续培养是不断地往反应器中加入营养物，利用罐中的菌体增殖得到产物，并不断采出。在良好的控制下，罐内的增殖速度可以与采出速度相同而达到稳态，选择好的状态操作可以大大提高生产能力。实际进行连续培养有两类反应器：一类是搅拌

罐式反应器，因其罐内各种物理化学参数均一，这种反应器又叫恒化器；另一种是管式反应器。使用恒化器，罐中可以通气，操作比较方便。管式反应器则不易解决通气问题，而且形成的污垢不易清洗，因此在生物培养中用得不多。

(3) **半连续操作** 这种方式介乎批式与连续操作之间，常用的一种是在批式培养过程中不断补入营养物，以解决营养物的抑制及不足问题，这种方式常叫做补料批式或流加过程，在近年生物培养中常常采用这种方式以造成更好的培养环境，提高设备效率；另一种是在补料的同时间断地采出一定量的发酵液体产物，延长发酵培养周期。发酵周期常常由于菌体的老化而决定结束。

连续和半连续操作利于过程的优化是近代生物化工的方向，但这两种操作因有物料的流入、采出，因此一定要严格防止杂菌的污染，对设备的操作控制要求比较高。

生物反应器的计算中用到的一个最重要的关系是物料平衡，又叫物料衡算，实际是物质不灭定律在化学反应器中的应用。

在进行衡算时一定要考虑以一个对象为核心，其流入该部分的量等于流出的与反应消失的及积累量三者之和，即

$$\text{流入量}=\text{流出量}+\text{反应消失量}+\text{积累量} \tag{1-11}$$

所考虑的对象要求其中是均一的(浓度、温度)，可以是一个混合很好的整个设备，也可以是一个微小体积又叫体积微元。此外衡算是针对一定的组分，如菌体、营养物中的任一种、产物等我们感兴趣的组分，在进行衡算中还要注意选定一定的时间，如整个发酵周期或单位时间等。

流动式反应器要考虑其流入及流出，批式反应器只有式(1－11)的最后两项。

二、批式反应器

批式反应可以用各种反应器，其中以机械搅拌式和气升式用得最多。本节只讨论机械搅拌式反应器的特点。前面已介绍过它的基本结构部分，图 1－8 和表 1－2 中给出其主要的结构尺寸。

表 1－2 发酵罐的几何尺寸

操作容量 L	D_i/D_t	H_L/D_t	H_t/D_i	H_{i1}/D_i	H_{i2}/D_i	H_b/D_i	N_i
100	0.55	0.84	1.0	1.0	—	0.52	1
700	0.45	1.21	2.1	2.1	—	0.88	1
1500	0.50	1.17,1.34	1.11,1.35	1.11	1.8	0.48,1.33	2
4100	0.30	1.38	1.0,1.3	1.30	2.0	1.0,1.3	2.3
42000	0.32	1.32	1.26	1.26	—	1.24	2

D_i—搅拌桨直径；D_t—发酵罐直径；H_L—罐体装液高度；H_{i1}，H_{i2}—搅拌桨层间距离；N_i—搅拌桨层数；H_b—下搅拌桨距罐底高度；H_t—上搅拌桨距液面高度。

所列的结构尺寸中最重要的是罐体的高径比 H_L/D_t 及 搅拌桨直径与罐直径之比 D_i/D_t。如表所示 H_L/D_t 对于小罐在 1 左右，大罐在 1.4～1.5 之间。为了提高罐内氧气利用率，近年来不少设计中 H_L/D_t 加大到 2～2.5 左右，而 D_t/D_i 一般以 3 左右为宜。常用的搅拌器有平桨、弯叶及箭叶(燕尾)等类型，小型罐的搅拌器多为平桨(4～6 叶)。桨叶的宽度及高度一般是桨直径的 0.2～0.25。罐壁设有档板，其宽度一般为罐径的 0.1 左右。在发酵罐设计中还有几个重要参数，如通气量及搅拌功率，这将在发酵罐放大一节中讨论；冷却面积，针对不同发酵过程放热量的大小，冷却所需面积各异，如青霉素发酵经验认为冷却面积应在每立方米发酵液

$1m^2$ 左右。

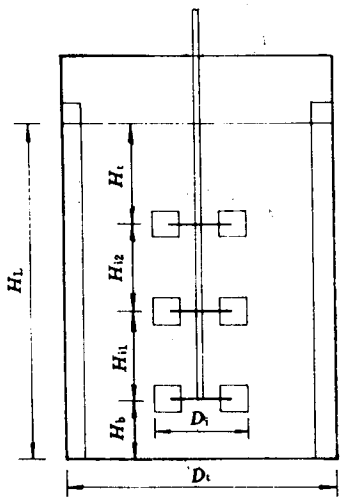


图 1－8　带有多层搅拌桨发酵罐示意图

设计一发酵装置所需罐大小的基本计算公式为：

$$V_T=P_y/[C_1\cdot C_2\cdot P\cdot T_y/(T+T_L)] \qquad (1-12)$$

式中　V_T 为发酵罐几何体积，m^3；　　P 为发酵液中产品浓度，kg/m^3；

P_y 为目的产品的年产量，kg；　　T_y 为每年总开工小时数，一般 7200～7500h；

C_1 为发酵罐的装料系数，一般 0.6～0.7；　　T 为发酵周期，h；

C_2 为从发酵液中提得产品的收率；　　T_L 为发酵批次之间准备时间，h 。

由(1－12)可以看到，决定发酵罐总体积的因素是 3 个方面：一是生产能力 P_y 的要求；二是一些操作条件的确定，如 C_1、C_2、T_y、T_L 等；三是动力学参数即发酵液浓度与发酵时间。其中操作条件主要根据操作经验、体系的特点来确定。而动力学参数 P 和 T 的确定有两种方法：

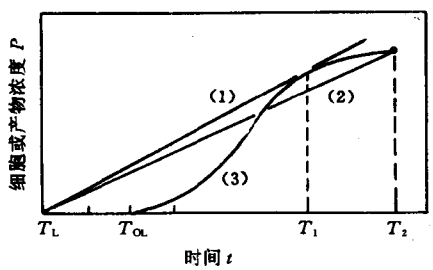


图 1－9　批式培养中的生产率

1—最大生产率；2—总生产率；3—产物的生产率

第一种是通常所用的依据工艺优化的方法，即在不同条件下作发酵产物随时间的变化，并优化之。对简单以细胞量为产物的情况可参见图 1－9。

由图可见由 T_L 到 $P\sim t$ 曲线切线的斜率为产物的生产率。如发酵在 T_1 结束可得到最大生产率，即在单位时间内由单位体积的发酵罐可以得到最高的产量。如发酵在 T_2 结束，虽然可以得到更高一点的产物浓度，但生产率有明显下降。实际发酵周期的选择还要考虑到基质利用率的高低、产物分离的难易等等。

第二种确定 P、t 关系的方法是根据前面介绍的动力学关系，再通过设备特点进行计算。下

面举一个简单的例子来说明这种方法。

例：用批式反应器培养单细胞蛋白，菌体的生长符合 Monod 关系，基质只消耗于菌体生长，即其它消耗可以忽略不计。

批式反应器中物料衡算的基本关系是：

$$\text{反应器中的积累量}=-\text{反应所消失量} \tag{1E—23}$$

先对生物量进行衡算。作衡算时要取一时间间隔，如取一足够的时间间隔可以得到：

$$\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t}=\mu x \tag{1E—24}$$

由 Monod 关系得到：

$$\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t}=\frac{\mu_m S x}{K_s+S} \tag{1E—25}$$

如果批式反应器中有良好的混合，则上述关系代表了整个反应器内细胞浓度的变化。上述关系给出了细胞浓度随时间的变化，其变化率与基质浓度及细胞浓度有关，基质浓度的变化为：

$$\frac{\mathrm{d}S}{\mathrm{d}t}=-Y\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} \tag{1E—26}$$

式中 Y 是基质对细胞的得率(g 基质/g 细胞)。如在发酵过程中 Y 不变，而且 $t=0$ 时 $x=x_0$，$S=S_0$，则

$$S=S_0-Y(x-x_0) \tag{1E—27}$$

把(1E—27)关系式代入(1E—25)式得到：

$$\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t}=\frac{\mu_m x(S_0+Yx_0-Yx)}{K_s+S_0+Yx_0-Yx} \tag{1E—28}$$

(1E—28)式是包含 x、t 的一阶微分方程，它又是可分离变量，积分求解得到：

$$\mu_m t=-\frac{1}{S_0+Yx_0}\ln\frac{S_0+Yx_0-Yx}{x}\cdot\frac{x_0}{S_0}+\ln\frac{x}{x_0} \tag{1E—29}$$

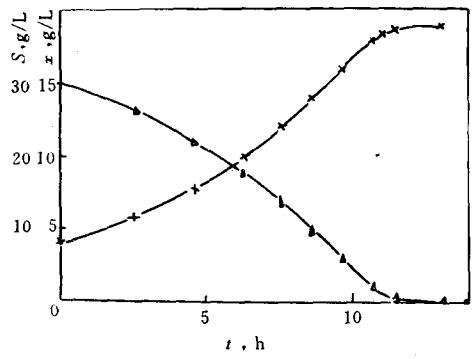


图 1－10　批式发酵中菌量与基质浓度随时间变化的计算曲线
△—S；×—x

求解时仍用到前面所给的初始条件，解得(1E—29)式，给出了 x 与 t 的关系。对于一酵母菌发酵的实例如 $\mu_m=0.15\mathrm{h}^{-1}$，$K_s=0.2\mathrm{g/L}$，$Y=2$g 糖/g 菌，$S_0=30\mathrm{g/L}$，$x_0=4\mathrm{g/L}$。由式(1E—29)及式(1E—27)可以求出 x 与 S 随时间变化的曲线图 1－10。由图可见，由于基质的消耗，菌量在 12h 以后已不再增长而且基质浓度也几乎为 0。

这个例子是菌体生长符合 Monod 关系，而且基质只消耗于菌体生长的简单情况，只要能

用数学方式表达比生长速率与各量的关系及各动力学方程也可以用数值积分方法求出过程曲线，以对过程进行定量的分析。

三、连续搅拌罐反应器——恒化器

恒化器的基本操作模式如图 1－11 所示。物料连续地以体积流量 F 流入反应器，并以同样流量流出去。流入物流中基质浓度为 S_0，菌浓度为 x_0，x_0 一般为 0，反应器内有很好的混合，即各点浓度一样。恒化器的操作特点是其流出物流的浓度与反应器内相同，而且加入的物流一进入反应器立即与反应器内物料均匀混合。

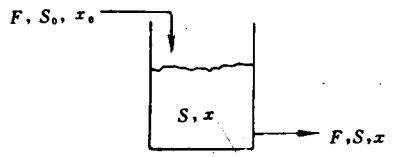


图 1－11　恒化器的基本操作模式

下面来分析一下恒化器的设计方程及操作中的定量关系。

从前面给出的物料衡算关系可以作出菌体的平衡关系：

$$\frac{Fx_0}{V}-\frac{Fx}{V}+\mu x-ax=\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t} \tag{1—13}$$

式中 V 是反应器的有效体积；a 是菌体死亡速率常数。式中各项自左到右分别为菌体流入速率、流出速率、增长速率、死亡速率、积累速率。在稳态操作情况下可以假设：

①$x_0=0$，即入口仅加入基质(S_0)；

②反应器无积累，$\mathrm{d}x/\mathrm{d}t=0$，$\mathrm{d}s/\mathrm{d}t=0$；

③菌体死亡速率远较生长速率低，$a\ll\mu$，由上式可以得到

$$\frac{F}{V}x=\mu x \tag{1—14}$$

F/V 表示单位体积反应器单位时间加入的流体量，它表示反应器内物料被“稀释”的程度，故定义为稀释率，用 D 表示，即

$$D\equiv F/V \tag{1—15}$$

这样由(1—14)式得到恒化器在稳态操作下一个很重要的关系：

$$D=\mu \tag{1—16}$$

用物料衡算的方法作基质的平衡得到：

$$\frac{F}{V}S_0-\frac{F}{V}S-\frac{\mu x}{Y_{x/s}}-mx-\frac{q_p x}{Y_{p/s}}=\frac{\mathrm{d}s}{\mathrm{d}t} \tag{1—17}$$

式中前两项表示基质流入及流出速率，第三项到第五项表示基质消耗于生长、维持及产物生成的速率，等式右边是反应器内基质积累速率。考虑在简单情况下的稳态操作可作如下假设：

①$\mathrm{d}s/\mathrm{d}t=0$；　②$mx\ll\mu x/Y_{x/s}$；　③$q_p x/Y_{p/s}\ll\mu x/Y_{x/s}$。

第二、三假设在菌体快速生长期可认为是正确的。这样则(1—17)式简化可得到：

$$D(S_0-S)=\mu x/Y_{x/s} \tag{1—18}$$

与(1—16)式结合得到

$$x=Y_{x/s}(S_0-S) \tag{1—19}$$

由式(1—16)和(1—19)可知，恒化器的操作参数 D 是可以改变的，只要与菌体的比生长速率

相同即可。由 $D=\mu$ 可推出 $Dx=\mu x$，它表示单位时间单位体积流出的菌量与单位体积生成的菌量是相等的，这当然是一种稳态操作，而且随着 D 的改变 μ 是可以改变的，同时相应的出口菌浓度及残余基质浓度也是变化的，它们的变化取决于比生长速率与基质浓度及菌浓度的关系。对简单的符合 Monod 关系的情况由式(1－18)可以推出：

$$\left(\frac{\mu_m S}{K_s+S}-D\right)x=0 \tag{1—20}$$

上式是在 $x_0=0$ 情况下符合 Monod 关系的恒化器模型，与式(1—19)结合得到：

$$x=Y_{x/s}\left(S_0-\frac{DK_s}{\mu_m-D}\right) \tag{1—21}$$

$$S=\frac{DK_s}{\mu_m-D} \tag{1—22}$$

上面两个式子给出了 x 和 S 与 D 的关系。显然当 $D\to 0$ 时 $S\to 0$，表示几乎所有的基质都被菌体耗尽得到最高的菌量 $S_0Y_{x/s}$。而 D 由很低值增加，开始时 S 随 D 线性增高，当 $D\to\mu_m$ 迅速提高，相应的出口菌浓度 x 则开始线性下降，后来迅速下降到 0。由式(1—21)可以求出当 $x=0$ 时的 D 值，即最大的稀释率 D_{max}。

$$D_{max}=\frac{\mu_m S_0}{K_s+S_0} \tag{1—23}$$

当稀释率达到 D_{max} 时所有细胞将被冲出反应器，因此这个点又叫“洗出点”(Wash out point)。

对于一定反应体积的恒化器，稀释率提高表示流入及流出的体积流量增大，但流出的菌浓度又是逐渐下降的。恒化器对细胞的生产能力 p 为：

$$p=Dx \tag{1—24}$$

p 表示单位体积反应器单位时间所产生的细胞量。因 D 与 x 是相反变化的有制约的因素，把式(1—21)与(1--24)结合得到它们对生产能力的影响：

$$p=Dx=DY_{x/s}\left(S_0-\frac{DK_s}{\mu_m-D}\right) \tag{1—25}$$

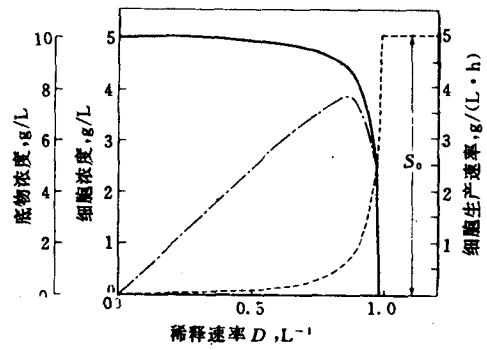


图 1－12 Monod 恒化器中流出液菌浓度、基质浓度、生产能力随稀释率的变化
——：细胞浓度；—·—：细胞产量；－－－：底物浓度

把式(1—25)对 D 求导数，取极值，得到达到最大生产能力时的稀释率 D_m 及相应的浓度 x_m 为：

$$D_m=\mu_m\left(1-\frac{K_s}{K_s+S_0}\right) \tag{1-26}$$

$$x_m=Y_{x/s}\left[(S_0+K_s)-\sqrt{(K_sS_0+K_s^2)}\right] \tag{1-27}$$

图 1-12 给出了 Monod 恒化器中稀释率与生产能力、出口菌浓度、基质浓度的关系曲线，计算依据是

$$\mu_m=1.0h^{-1},Y_{x/s}=0.5,K_s=0.2g/L,S_0=10g/L$$

根据上述恒化器的设计原理，只要知道比生长速率及得率系数的关系就可以设计计算了。上述方程都是代数方程，故解法简单是恒化器的优点。由式(1—14)也可以通过实验来测细胞培养的比生长速率的变化规律。

上面讨论中我们关心的主要是基质浓度、菌浓度及稀释率的关系，在实际体系中有时利用恒化器中稳态的特点侧重研究 pH 值、溶氧的影响，相应的叫恒 pH 反应器(pH -Stat)、恒溶氧反应器(D. O -Stat)。

为克服随着生产能力 p 的提高出口菌浓度下降、基质浓度有所提高，对于产物提取及原料利用都是不利的矛盾，可以从设备及操作方面来改进。常用的方法一是采用多级串联恒化器；二是在菌液出口处加一个菌体浓缩器并把浓缩液返回以提高设备内菌浓度，增加生产能力。

第四节　生物反应器的放大

一、概述

1. 氧的供给

我们以酵母为例来说明供氧的重要性。酵母在不同基质上生长的耗氧量是不同的，以葡萄糖为碳源耗氧约为 0.8～1.2g 氧/g 细胞；以甲醇为碳源耗氧为 2.5g 氧/g 细胞；以碳氢化合物为碳源耗氧为 2.5～3g 氧/g 细胞。表 1-3 给出耗氧与消耗葡萄糖的对比。

表 1-3　酵母生长葡萄糖与氧耗对比

情况	葡萄糖	氧
发酵液中浓度，g/ml	10000×10^{-6}(1%)	7×10^{-6}(饱和值)
临界浓度(维持)，g/ml	50×10^{-6}	0.7×10^{-6}
典型需求速率	3.2mmol/(g 细胞·h)	6.5mmol/(g 细胞·h)
扩散系数	$0.65\times10^{-5}cm^2/s$	$1.8\times10^{-5}cm^2/s$

由表 1-3 可以看出，与葡萄糖相比在发酵液中氧量少得多，消耗速度又快，因此常常成为菌体生长的限制因素。

氧是如何得到供应的呢？实验得知，在深层培养中菌体摄取的是溶解的氧，即气相的氧先溶在发酵液中再传递给菌体。根据化工原理得知氧从气泡传给发酵液的速率：

$$OTR=k_La(C^*-C) \tag{1-28}$$

式中 OTR 为供氧速率，mmol/(L·h)；

C^* 为与气泡中的氧成平衡的液相氧浓度，mmol/L；

C 为发酵液中氧的浓度，mmol/L；

k_La 是传氧系数，是液膜传氧系数与气液两相比界面的乘积，h^{-1}。

在发酵中用空气来供氧，其中氧分压仅 21kPa，在 25℃下与空气相平衡的水中的溶氧为 8×10^{-6}g/ml，即为 0.25mmol/L。发酵液中氧浓度 C 对菌体生长是很重要的，C 过低则会使菌体停止生长，这时的 C 值叫临界氧浓度 C_L。对各种菌 C_L 值不尽相同，大肠杆菌在 37.8℃下 C_L 为 0.26×10^{-6}g/ml，酵母菌在 34.8℃下 C_L 为 0.16×10^{-6}g/ml。溶解氧也可用相对饱和溶氧的百分数来表示，如上例中 0.16×10^{-6}g/ml 相当于 2%。不同的菌耗氧速率也不尽相同，如酵母菌在一般培养条件下 OTR 可达 135mmol/(L·h)，产黄青霉素可达 30～50mmol/(L·h)。通过上面的分析，C^*、C 都有一定限制，而且供氧速率 OTR 又应满足菌体生长的要求，所以发酵反应器的设计应力求有高的传氧系数 k_La。

常用 k_La 的测定方法有直接测定法、动态法、亚硫酸盐法等。

(1) 直接测定法

根据反应器内氧的衡算可得到容积供氧速率：

$$OTR=k_La(C^*-C)=\frac{7.32\times10^5}{V}(F_iP_iY_i/T_i-F_oP_oY_o/T_o) \qquad (1-29)$$

式中 V 为发酵液体积，L；　　Y 为氧的分子分数；

F 为空气体积流量，L/min；　　T 为气温，K。

P 为空气压力；　　下标 i、o 分别为入口及出口条件。

式(1—29)中 C 可用溶氧电极测出；Y 通过气体氧分析仪表测定；F、T、P 均用常用的仪表测量。测得入口及出口各参数后用上式即可算出 k_La。在简化条件下忽略入口及出口间流量、温度变化，只用溶氧电极及尾氧分析仪测出发酵液中溶氧值及尾气中氧浓度，并测出气体体积流量及发酵液体积就可估算出传氧系数。对耗氧多的深罐发酵，因入口与出口气中含氧量变化大，为测准 k_La 应用对数平均 C^*-C 来计算。

(2)动态法

直接测定法计算简单，但所用传感器较多，尤其尾氧分析仪价格较高，精度有限。在实验室可用动态法来测，只需一支溶氧电极就可以了。其原理是作发酵罐内氧的物料平衡：

氧的积累量＝供氧量－耗氧量

即
$$\frac{dc}{dt}=k_La(C^*-C)-qx \qquad (1-30)$$

式中 q 表示菌体比耗氧速率(mmol 氧/(g 细胞·h))，其它量的意义同前。式(1—30)整理得：

$$C=C^*-\frac{1}{k_La}\left(qx+\frac{dc}{dt}\right) \qquad (1-31)$$

只要测出 qx 及 $C\sim t$ 变化关系，用 C 对 $qx+\frac{dc}{dt}$ 作图，所得直线斜率就是 $-1/k_La$。具体做法如图 1－13。

实验中维持发酵罐通气稳态操作，到时间 t_0 停止通气，这时溶氧浓度下降，到时间 t 再次通气，溶氧浓度逐渐上升，得到溶氧浓度 $C\sim t$ 变化曲线。曲线 $t_0\sim t_1$ 段，停止通气没有供氧，所以曲线斜率 dc/dt 为 $-qx$，再用 C 对 $qx+dc/dt$ 作图如图 1－14，得到一直线，其斜率即为 $-1/k_La$。

动态法测定所用传感器简单，但计算量大。用动态法测 k_La 还应注意：溶氧浓度在停气时不宜降得太低，以免细胞“窒息”，而使代谢途径变化；另外要注意消除溶氧电极滞后引起的曲

线变化，必要时要消除这些影响。

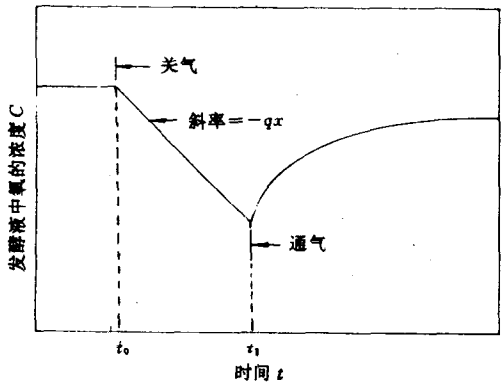


图 1－13　动态法测定传氧系数实验中溶氧浓度随时间的变化

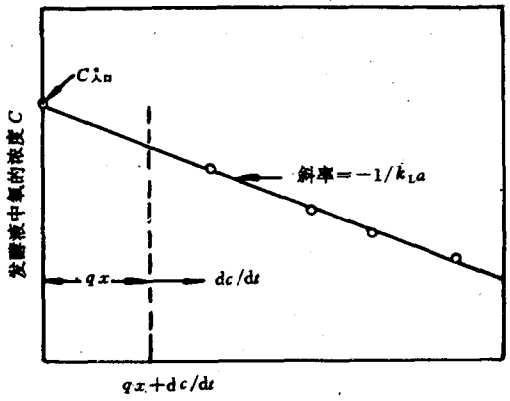


图 1－14　动态法计算传氧系数 k_La 图

2. 罐内流体的混合

罐内流体的混合一方面是为了加强氧的传递，另一方面使流体混合均匀避免局部过浓或过稀的现象并强化菌体与营养物的接触。

流体混合的好坏常用混合度和混合时间两个参数衡量。

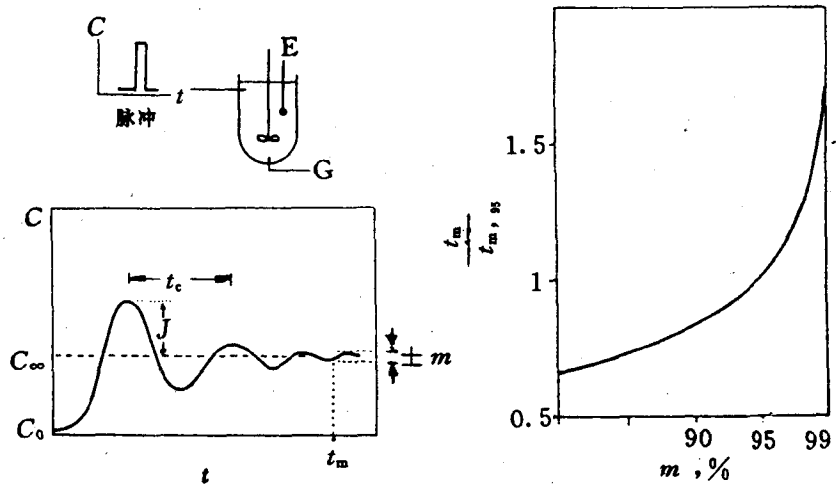


图 1－15　混合时间的测量及其与混合度的关系

混合度常用示踪法测定，其定义为：

$$m=\frac{|C-C_\infty|}{|C_\infty-C_0|}\times 100\% \qquad (1-32)$$

式中 C_0 为反应器内示踪物的初始浓度；

C_∞ 为加入一定量示踪物后平衡浓度；

C 为示踪物某瞬时浓度。

混合时间 t_m 定义为：达到一定混合度 m 所需的时间。具体测量混合时间示意如图 1－15。显然混合时间短些好。在反应器放大时混合时间往往要加长，通常小罐的混合时间仅为几秒，而大罐的混合时间往往需要几十秒以至分钟级。决定混合时间的因素比较多，除流体物性以外主要是搅拌转速(n)、搅拌桨直径(d_i)及罐体直径(d_T)，表 1－4 给出一些实验结果。

除了反应器内整体的混合外，局部的微观混合也很重要，微观混合影响菌体的形态和活力。有人做过用 *A. niger* 菌株生产柠檬酸小试，发现对不同菌株有不同的最佳产酸搅拌转速，但菌量随转速的变化并不随转速而不同。

表 1－4 混合时间 t_m 与 n、d_i、d_T 的关系

关 系	参 考 资 料
$t_m\sim n^{-1}$	Kramers and Alberda, 1953
$t_m\sim n^{-1}d_i^{\frac{1}{4}}$	Khang and Levenspiel, 1979; van de Vusse, 1955
$t_m\sim(nd_i^2)^{-\frac{2}{3}}$	Norwood and Metzner, 1960
$t_m\sim n^{-1}(\frac{d_i}{d_T})^{-2}$	Holmes et al, 1964
$t_m\sim n^{-\frac{2}{3}}$	Biggs, 1963
$t_m\sim n^{-1}(\frac{d_i}{d_T})^{-2.0\sim-2.5}$	Prochazka and Landau, 1961
$t_m\sim n^{-1}(\frac{d_i}{d_T})^{-\frac{5}{3}}$	Mersmann et al, 1976
$t_m\sim n^{-1.0\sim-0.6}$	Stenberg, 1984
$t_m\sim n^{0.85\pm0.07}d_T^{-0.23\pm0.14}$	Stenberg, 1984

二、搅拌及传氧

1. 搅拌

反应器搅拌的一个重要的参数是通过搅拌器输入到流体的功率值。在低速搅拌下，流体呈层流，消耗功率少；在高速搅拌下，流体呈湍流，混合好，消耗功率也增加；层流与湍流中间还有一过渡流区，这些在化工原理中有详细介绍。

决定搅拌功率的除了搅拌桨转速与直径外还有两个重要的因素，一是流体的流动与性质，一是通气与否。流体流动性质依其切变速率与剪切力之间的关系可分为牛顿型流体与非牛顿型流体。牛顿型流体切变速率与剪切力成比例，比例系数为粘度，非牛顿型流体则不成比例。一般细菌、酵母在低浓度下为牛顿型流体，丝状菌或高密度培养时发酵液呈非牛顿型流体性质。研究搅拌功率往往从最简单的情况开始：先研究牛顿型流体不通气时功耗 P_0，再研究牛顿型流体通气时功耗 P_g，再研究非牛顿型流体不通气及通气时的功耗。

还要说明的是搅拌功耗与发酵体系特性及发酵罐的几何尺寸、操作特点都有关系，仅发酵体系就有多种多样，因此文献已发表的关于功率计算式子也多种多样。本章仅就比较通用而且简单的情况作一介绍。

(1) 牛顿型流体不通气情况下的功率 P_0　为计算 P_0 需要了解两个无因次数群，化工上叫准数：描述流动特点的雷诺准数 N_{Re} 和功率准数 N_p，它们的定义为：

$$N_{Re}=d_i^2 n\rho/\mu \tag{1—33}$$

$$N_p=P_0 g/(n^3 d_i^3 \rho) \tag{1—34}$$

式中　d_i——搅拌桨直径；　　μ——培养液粘度；

n——搅拌桨转速；　　g——重力加速度。

ρ——培养液密度；

只要使用同一单位制数据，上面两准数均为无因次数。实验得出不同桨叶搅拌桨两准数关系如图 1－16。由图看出在 N_{Re} 较小时，即层流区，N_p 与 N_{Re} 在双对数图上成直线关系；当 N_{Re} 高时，即湍流区，N_p 维持为一常数；过渡区的关系较复杂，还没有好的关联关系。

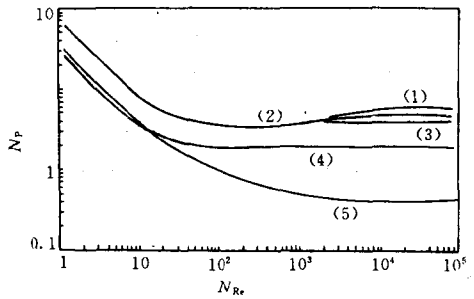


图 1－16　各种搅拌桨叶 N_{Re} 与 N_p 之关系
1—Rushton 式六叶涡轮；2—Bates 式六叶涡轮；
3—六叶搅拌桨；4—四叶搅拌桨；5—螺旋桨

把准数定义式代进去，用图 1－16 的关系求出在层流区：

$$P_0=K_1\frac{n^2 d_i^2 \mu}{g} \tag{1—35}$$

在湍流区：

$$P_0=K_2 n^3 d_i^5 \rho/g \tag{1—36}$$

式中 K_1 及 K_2 为比例常数。

这样，只要知道几何参数及操作条件就可以求得不通气情况下的功率了。还要说明的是对深罐中有多层搅拌桨的情况，只要各层桨叶之间的距离符合前面的比例，总的功耗与桨叶层数成正比。

(2) 牛顿型流体通气情况下功耗 P_g　经验得知，通气情况下搅拌功率大大下降，而且随着通气的提高功耗下降得越多。

在研究定量关系时，首先定义一个新的准数——通气准数 N_a。

$$N_a=Q/(nd_i^3) \tag{1—37}$$

式中 Q 是气体的体积流量。实验得到不同桨叶下 P_g/P_0 关系如图(1－17)。

把具体数字代入，Michel 和 Miller 得到：

$$P_g=K(P_0^2 n d_i^3/Q^{0.56})^{0.45} \tag{1—38}$$

至于非牛顿型流体又有许多类型，而且其流动与功率消耗的关系更复杂，针对具体体系有一些规律，不同作者得出的规律也不尽相同，但所用的基本原理与上面介绍的类似。

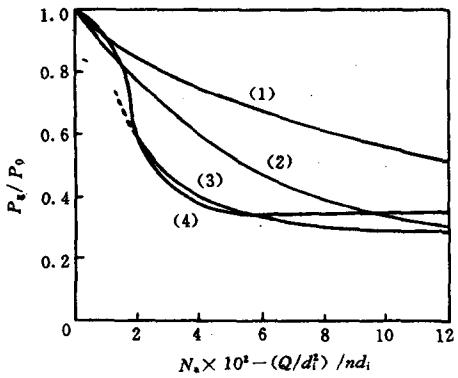


图 1－17　各种搅拌情况下，通气与不通气功率之比与通气准数的关系

1—平桨涡轮($n_b=8$)；2—叶盘式($n_b=6$)；3—叶盘式($n_b=4$)；4—短桨

2. 氧的传递

前面已讲过，氧的传递能力的好坏是由 k_La 来衡量的，它受流体物性、反应器尺寸、操作条件等各方面的影响。氧的传递又常限制细胞的生长，所以这里我们先研究一下摇瓶培养中的传氧，再研究发酵罐中的传氧。

(1) 摇瓶培养中的传氧　氧的传递除受流体物性的影响外，主要受摇动频率(r/min)、装料体积及有无档板的影响，表 1－5 给出用亚硫酸钠溶液测得的传氧系数、供氧速率(OTR)与各因素的关系。因亚硫酸钠溶液中溶氧量为 0，所以这里给出的是最高的 k_La，实际体系值要低些。

由表中数据看出体积增加、频率下降及无档板对传氧都是不利的，实验室数据在放大成罐操作时还是很有参考价值的。

表 1－5　摇瓶培养中供氧速率(OTR)及传氧系数 k_La 与条件的关系

条件	200r/min，25ml 装量，500ml 瓶		400r/min，无档板，500ml 瓶			25ml 装量，500ml 瓶，无档板				
	档　板		装　量，ml			频　率，min^{-1}				
	无	有	25	50	200	100	200	300	400	500
OTR	44	106	90	50	20	40	44	55	85	100
k_La	286	688	584	325	130	260	286	357	552	650

(2) 搅拌罐中的传氧系数 k_La　搅拌罐中的传氧系数与体系的特性、罐及搅拌桨的几何尺寸、操作参数等有关，不少研究者得出了许多关联式，因所用的罐体系和几何尺寸不同得到的式子有些是矛盾的。下面只介绍几个文献上常引用的关联式。

Cooper 式：$k_La=K(P_g/V)^{0.95}V_s^{0.67}$　(1－39)

Richards 式：$k_La=K(P_g/V)^{0.4}V_s^{0.5}n^{0.5}$　(1－40)

多层桨：$k_La=(\alpha+\delta N_i)(P_g/V)^{0.56}V^{0.7}n^{0.4}$　(1－41)

式中 V_s 是罐内气体表观线速；α、δ、K 均为常数；N_i 是桨叶层数。其中式(1—39)常常被一些作者引用来讨论传氧的强化。由该式显然得出 k_La 与功耗的 0.95 次幂成比例，而与气速的(实际即通气量)0.67 次幂成比例，从这个角度提高搅拌功率的输入是提高传氧系数的更有效的办法。80 年代以来国外有种趋势即高功率输入达 2～4kW/m³，低气量 0.3～0.6VVM (VVM 是生物化工中常用的空气计量单位，含义是每分钟单位体积发酵液得到的空气体积

数，min^{-1})(m^3 空气/(min · m^3 发酵液))，而我国相应功耗低仅 1～1.5kW/m^3，高气量 1～1.2VVM，从能量利用角度是不合理的。但有些研究者得出的结论却有些不同，认为提高通气量同样是有效的办法。

三、生物反应器的放大原则

生物反应器的类型很多，所适用的体系也各异，因此生物反应器的放大是比较复杂的。传统生物化工生产中往往以 1∶10 的倍数放大。近年来应用化学工程技术在放大方面建立了许多方法，下面结合机械搅拌罐反应器来介绍一些放大准则。

1. 几何相似

按小的与大的装置各部几何尺寸比例大致相同放大。即当体积放大 10 倍时，设备直径和高度均放大$\sqrt[3]{10}$倍。当然为避免设备直径过大，大设备的 H/D 往往大一些，由 1 到 2.5 左右。

2. 恒定等体积功率放大

这个方法以前用得较多，比较简单，也可保证罐内有良好的混合。由 P_g/V 恒定，从式(1—36)和(1—38)可知应保持 $n^3d_i^2$ 恒定，即

$$n_2^3 d_{i2}^2 = n_1^3 d_{i1}^2 \tag{1—42}$$

当大罐几何尺寸确定以后可以计算所需搅拌转速如下：

$$n_2 = n_1\left(\frac{d_{i1}}{d_{i2}}\right)^{2/3} \tag{1—43}$$

3. 恒定传氧系数 k_La 放大

这个方法抓住了传氧这一关键因素，目前应用的很多。具体应用中要注意几个问题。

① 小试中要测得准确的 k_La 值，选择合适的计算公式。

② 注意各计算 k_La 公式在放大中参数的变化及适用范围。

③ 按照计算 P_0/P_g 选择通气比，计算 V_s 求 k_La 来计算。在选择通气时应注意如果选择同样通气量(VVM)，大罐因深度加大，气体线速会提高，传氧会好些。考虑这一因素大罐通气比有时可以小些。

4. 恒定剪切力-恒定叶端速度(πnd_i)放大

剪切力 S 与搅拌桨叶端速度成正比，在恒定体积功率放大时一般维持 $n^3d_i^2$ 不变，这样两系统切变力之比应为：

$$\frac{S_2}{S_1} = \left(\frac{d_{i2}}{d_{i1}}\right)^{1/3} \tag{1—44}$$

这样随着放大，搅拌桨引起剪切力加强而对有些菌体生长代谢是不利的，所以有些人认为放大应维持叶端速度恒定，一般认为合适的范围为 250～500cm/s。

5. 恒定的混合时间 T_M 放大

前面分析过混合时间对反应器内维持均匀的化学环境是很重要的。研究结果表明，对几何相似且单位体积功率恒定的两个罐而言，其混合时间的关系为：

$$\frac{T_{M1}}{T_{M2}} = \left(\frac{d_{i1}}{d_{i2}}\right)^{\frac{11}{18}} \tag{1—45}$$

显然大装置的混合时间加长，对于混合是不利的。

除上面的几个准则外，还有人主张考虑 N_{Re} 及动量因子来放大，这里不一一介绍。

要说明的是以上各因素的考虑各集中在一个侧重点，得出的结论往往有较大差异。表 1－

6 为由 10L 小罐($n=500r/min$,通气 1VVM)放大到 10000L(即放大 1000 倍)时按照不同放大准则得出的结论按搅拌转速来作的比较。由表中数据可以看到按照不同准则放大,放大后罐的操作条件是不一样的。

这说明在放大中选用什么准则是要积累较多的经验的,多参考一些放大的实例,加上对所做体系特点的深入分析,目前放大的比例已有较大提高,放大 100 倍甚至更大,成功的例子已有不少。相信随着对生物反应器知识的进一步积累,不断进行跨学科的合作,生物反应器会得到更快的发展。

表 1-6 放大方法的比较

方 法	10000L 罐搅拌转速,r/min	方 法	10000L 罐搅拌转速,r/min
等体积功率		等叶端速度,nd_i	50
非通气	107	等混合时间,T_M	1260
通气	85	等动量因子,M_i	5
等传氧系数,k_La	79		

第五节 生物反应器的控制及优化

一、生物反应器的控制

生物反应器控制的目的是在实际发酵过程中实现在工艺和动力学等研究中得到的工艺条件。最常用的基本变量及其调节方法见表 1-7。

表 1-7 基本变量及其调节方法

变 量	主要控制方法
温度	冷源或热源流量
pH 值	加入酸或碱
空气流量	空气入口或出口阀门
搅拌转速	改变驱动电机转速
溶氧(DO)	调节通气量、罐压或搅拌转速
泡沫高度	加入消泡剂、调节罐压、搅拌或通气量
罐压	尾气阀门的开度

常用的控制方法是反馈调节,其实现过程如图 1-18 所示。

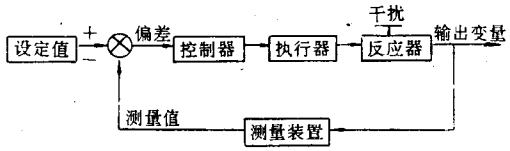


图 1-18 反馈调节示意图

由图 1-18 可以看出变量的控制除了设定值要由工艺及动力学优化确定以外,具体实现要靠 3 个部分:测量装置、控制器和执行器。

控制器相当于“大脑”,分析测量值与设定值之间的偏差,决定控制策略。可以用传统的仪表,也可以用单片机等实现。

执行器是控制的“手”,常用阀门、计量泵、计量罐等实现。

测量装置是控制者的“眼睛”,其核心部分是传感器及放大变送装置。

在这3个部分中，测量装置的探头及执行器一般要与培养液接触。根据生物培养的特点对它们有以下特殊的要求：

(1) 能灭菌，无泄漏，以保证纯种培养；

(2) 长时间稳定工作，细胞培养过程一般要几十到上百小时，要求仪器稳定；

(3) 能在培养液这一特殊介质中进行有效的测量，如抗气泡干扰、防止微生物附着及干扰、便于清洗等等。

(4) 为满足过程实时控制，需要量测得到的信号最好是电信号。

为了实现细胞培养过程的有效控制，首要的是要解决量测问题。表1-8及表1-9汇总了近年来有关过程量测的一些资料。

表1-8 过程物理量的量测

物理量	方 法	说 明
空气流量	孔板	简单，响应是平方根
	旋涡流量计	在较小装置上不够稳定
	流道面积变化的流量计	准确可靠，但用在小设备上
	(转子流量计及 Gapmeter)	变换为电信号有困难
	热质量流量计	直接给出电信号，在洁净状态下使用良好
液体加料量	小计量罐	结构简单，在大型罐上常用，物料周期式小批量加入
	电磁流量计	无运动部件，可消毒，适合于导电物料，精度在200ml/min以下可达1%
	计量泵，隔膜泵	后者可消毒，价格昂贵，适于中试
	蠕动泵(厚壁)	可耐0.1MPa压力，精度1%，可消毒，与机械部分无关，可用于小流量2.5ml/h，不堵，但一般不易给出反馈信号
	电子秤(Load cell)	易联机，可校验累计加入量，价格贵
泡沫或液面高度	电导或电容探头	不够准，易沾污，需常清洗，目前应用较多
	γ 射线传感器	目前应用较少
	摄像机	目前应用较少
发酵罐内装量	差压变送	易有噪声并受消毒影响，目前应用较多
	多晶硅微压变送器	可精确到1cm/m，有试用的报道
	电子秤	最好，但价格贵
压力	覆膜传感器	好用
转速	测速电机	目前应用较多，精确度不很高
	位置变送器(光学)	精确(Position encoder)
	距离传感器	精确(Proximity sensor)
功耗及扭力	测定扭力及转速	计算得功耗，适于小罐
	功率表	包括了传动功耗，不易校正
	轴扭力表	准确但昂贵(15000美元/套)，易受热及温度变化影响
	用温升估算	在25m^{3}罐中用过
粘度	在线联机的毛细管粘度计	与生长及菌丝形态有关，但要积累经验来分析
	离线可用各种粘度计	对非牛顿型流体要在不同切变速率下测量才有意义
温度	Pt100电阻温度计	最好，但最好用双量程的(消毒、培养)
	热电偶	可靠性及精度不如上一种
发酵热	测量冷却热	用冷、热源维持恒温，测量冷却剂带出的热及加热电耗，适于小罐
	动态法	停止冷却，测温升，由体系热容计算放热，准确但有温度变化

续表

物理量	方　法	说　明
溶氧(*DO*)	原电池型	简单便宜适于中小罐，耗氧较大，受流动及气泡影响大，价格较便宜
	极谱型	需极化电压及放大器，但耗氧少，受流动影响小 (注：*DO* 电极应装在罐上部流动情况好、近液面处)
溶解 CO_2	覆膜电极	Ingold 可消毒，对数响应
	计算法	比饱和值高 10%左右
	浸没管式	有人提出 $D \cdot CO_2$ 用惰气带出再作气体测量。但因扩散慢，测量值不够准确
溶解的易挥发物	用半透膜真空抽样再以质谱分析	膜的通透性对气体有选择性，应予注意
pH 值	玻璃电极	分为插入式耐热灭菌及抽拉式化学冷灭菌两种。前者一般可耐 20～30 次热灭菌，后者使用期可达 1～2 年以上。其敏感玻璃易受蛋白质沾污，可用抗蛋白玻璃或清洗剂处理
氧化还原电位	以 Pt 及 Ag/AgCl 电极	在实验室罐应用，以研究氧化还原状态，但测量值可能受 *DO* 及 pH 值的影响

表 1－9　过程化学和生物量的量测

方　法	应　用　情　况
顺磁尾氧分析仪 红外 CO_2 分析仪	有多种型号产品提供，价格便宜，已普遍使用。存在问题： ①样品干燥及湿度影响测量结果，控制困难；②气压变化及气流速变化影响结果；③漂移(氧)；④CO_2 信号反应慢、滞后；⑤仪器噪声；⑥在实际测量中精度约 0.1%～0.2%(v/v)或更差一些，计算 *RQ* 误差更大
热导 CO_2 分析仪(TCD)、	标称量程 0～19.99%，精度 0.01%，正在试用
毛细管尾氧分析仪	标称量程 0.1%～25%，O_2 精度到 0.1%，正在试用
烧结金属氧化物气体分析器	可用于测量各种有机溶剂及可氧化气体，信号非线性，非特异性，在乙醇测量上已工业化了
质谱：四极质谱(QMS)	可以测定尾气中荷质比 300～600 以下的组分，监测多种组分含量随时间的变化，响应快(0.1s 以下)，可用于过程的动态分析，但其分析精度大大低于磁质谱，约低一个数量级左右。价格较便宜，已用在抗生素生产及科研中
磁质谱 定磁场多检测器 控变磁场单检测器	特点：①快，12s/罐尾气，故可在 15min 内测 60 个罐的样品；②准确，对 O_2、CO_2 偏差仅 0.3%；③稳定，6 个月以上；④需样量少，流量要求仅 100ml/min；⑤要防止水及颗粒、泡沫；⑥对 NH_3 测量有困难；⑦可用于测量各液相挥发组分。专为发酵尾气分析设计的，可以同时监测多罐尾气组成并计算出呼吸商。响应较快，也可用于过程动态分析，价格较贵
气相色谱(GC)	离线测量，用于分析尾气以及液相中挥发相组分，对乙醇分析线性范围达 80g/L
高效薄层色谱(HPTLC)	离线的，定量精度达±3%，便宜，比 HPLC 可靠，用于丙酮酸、葡萄糖酸、VC、甾体化合物分析
离子选择电极(ISE)	用 Ag/AgCl 或甘汞电极为参考电极，ISE 对离子浓度响应，已用于测量(Na^+、K^+、NH_4^+、Cl^-、Br^-、I^-、Ag^+、S^{2-}、F^-、Pb^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、NO_3^-)。应用局限：①工业发酵中其它离子干扰；②漂移；③离子颗粒干扰，油及固体污染；④不耐消毒，曾用 NH_4^+ 电极于实验室中，测滤液的 NH_4^+ 浓度

（续表）

方　法	应 用 情 况
电位型生物传感器	对有电位响应的电极如 pH 值、DCO_2、Redox 电极，覆上有机化合物、酶或微生物膜，膜上物质与某特定物质反应产物影响了电极电位而进行测量，如在 pH 电极上覆以有青霉素酶的膜，在青霉素存在时产生了青霉素酸，改变了 pH 值，从而测得青霉素浓度
电流型传感器	在有电流响应的电极如 DO 电极上覆有酶膜，其响应电流与特定组分浓度成比例，这种作用产生了电流，因此有传递及物质消耗作用，如在 DO 电极上覆 Gelatin 膜，使葡萄糖与氧反应，从而降低了 DO，测得葡萄糖量，已工业使用，每小时处理 60 个样品（联计算机），精度 1% 工业上曾用两个电流型传感器测量细胞量，对于枯草芽孢杆菌信号线性区达 2×10^9 个细胞/ml，重复性 8%，稳定达 400h
半导体器件	场效应管（FET）传感器，利用场效应管 transistor gate 对电流的作用测量，在门电极上覆膜带上酶、细胞等，可以测量液相甚至气相组分的浓度，如青霉素电极等
酶热敏传感器	利用底物与酶作用的热效应（<0.02℃）测量物质的含量，样品要求洁净（透析过滤）及无其它代谢作用，不怕有颜色样品，稳定，每日标定一次即可，工业上用于抗生素生产中
细胞量的测量	沉降法：简单，固形基质干扰测定结果，用分级（梯度）离心可部分解决这一问题 粘度变化：用于菌丝生物发酵，可以反映菌量的变化，但直接关系不好确定，菌体形态变化有干扰作用 过滤探头、综合滤速、滤液体积及滤饼体积几个值确定细胞量及细胞形态特点，用在实验室青霉素发酵控制上 光密度（$O.D$）：在清液中 $O.D$ 与菌量在一定范围呈线性关系，用小的探头可在线测量。存在问题：①杂散光干扰；②气泡、污物及微生物附着在探头上干扰；③在高 $O.D$ 下非线性；④蒸汽消毒的困难 荧光法（NADH）：激发波长 366nm，在 460nm 荧光，用以测量细胞量，特别是细胞“活度”，已有产品生产，并用在面包酵母发酵应用、工艺优化，得到高收率及效率。存在问题：①温度及 pH 值会改变分子的荧光效率及改变代谢活性；②氧代谢亦影响 NADH 到 NAD 的转换；③碳源枯竭会使 NADH 耗尽；④培养基中消泡剂及芳香组分干扰测量，气泡也干扰测量，因而很好地设计探头、标定是重要的。用在指数生长期测量结果是可以的 其它胞内物质的荧光检测：用适当的染色剂测量胞内的蛋白质、DNA 及 RNA 量，亦在实验室应用于细胞量的测量 通过氧耗量或放热来测知细胞量：取少量发酵液于不透气情况，用快速 DO 电极测量 DO，关联得菌量 间接测量法：用氧消耗速度（OUR）或二氧化碳释放速率（CER 或 CPR）关联得菌量值，本方法直接反映了菌体活动（呼吸），其在实践上的意义是很明显的，但这方法的可靠性受到数据测量及模型关联方面的误差影响

由上面两个表可以看出，目前对生物过程物理量的在线测量还是比较好的，化学及生物量的在线测量除尾气分析的外，存在一定的困难。特别是对生物过程至关重要的生物量的量测更困难一些。如表所示，目前应用相当多的是间接测量法如细胞的光散射、胞外 DNA－NADH 量、细胞的呼吸、细胞培养的放热等方法。这些方法在一定范围内还是成功的，也取得了较好的

结果。

二、生物培养过程的优化

1. 过程变量的关联及敏感量(变量或参数)的获得

生物培养过程最通常的目的有两个：一是得到足够的生物量，二是得到尽可能多的代谢产物。对于一个批式过程达到上述要求的手段可以由下式分析：

$$X_i = \int_0^t \mu x \, dt \qquad (1-46)$$

$$P_i = \int_0^t q_p x \, dt \qquad (1-47)$$

提高过程效率的关键是要提高菌体的比生长速率 μ 和产物的比生成速率 q_p。这两个参数都受到细胞所处的环境因素的影响，即物理变量 pH 值、温度、压力、$D.O$、DCO_2 等及化学变量即各种营养物的浓度的影响，诸多过程变量的影响往往不是等同的，在一定条件下往往只一两个量起决定的作用，它们的优化使过程效率会大大提高，这样的参数叫敏感量。

如何分析各变量的影响呢？从工程上可以有如下几种。

(1)变量关联法

这一方法是对过程代谢曲线、变量的变化进行统计关联。例如在对青霉素发酵过程进行了大量的研究后，得到在抗生素生产期培养液中糖的浓度在 3～10g/L 可以得到高的比生产速率。此外有人对这一过程进行了参数关联得到在抗生素生产期菌体比生长速率在 0.1h^{-1}左右，则产物的比生成速率可以达到高水平。又如在谷氨酸发酵的产酸期研究得到溶氧水平在30%饱和度可以得到最高的产酸水平。

由于生物过程受到很多变量的影响，而且对于生物来说这些影响不仅影响当时的活性，还将影响以后的活力，也就是说影响生物活力的变量包括着实时测得的变量值以及其历史变化。在进行变量关联时要进行大量的统计分析，而且不同的作者往往得出不尽相同的结论，正确的结论往往要经过长时间的积累和一番去粗取精、去伪存真的工夫才能获得。

(2)数学模型法

随着生物技术的发展、计算技术的进步，目前越来越多地用动力学模型来描述生物过程。随着模型的精细化研究，目前已经有可能对过程进行一些优化研究了。例如前面引用头孢霉素 C 发酵的例子中，用模型优化得到最佳初糖浓度为 30g/L，最佳加入蛋氨酸的时间应在发酵开始的 30h 以内。又如在十三碳二元酸发酵研究中，经模型分析在产酸期如以移出产物的方法降低产物的浓度会使产酸速率提高 20%～50%。以上例子所用的模型都在不同程度上结合了反应的机理。可以预料今后随着对生物过程的进一步研究这类模型还会得到越来越广泛的应用。

另外一类数学分析方法主要是依靠统计分析、显著性检验，除少部分与过程机理有关联以外，大多是"黑盒子"模型。利用这类方法对于一些过程也得出了有指导意义的结论。这类方法过去用过的有 Kalman 滤波分析、统计一致性检验分析。最近在生物过程分析中应用的人工神经网络方法(ANN)引起人们极大的兴趣，这个方法目前应用在生物培养过程培养基设计及过程诊断上是比较成功的。预期这一方法对于把小试结果转为中等规模放大过程的设计会有较大的作用。

2. 流加技术的应用

生物培养技术的发展说明在培养中应用流加(Fed－batch Technique)技术是优化过程化学环境的一项有效的方法。应用这项技术可以克服基质的抑制作用，不断保持优化的环境，可

以靠补充水份减低发酵液的粘度增进传氧，还可以增加罐的体积利用系数，以增加产量。流加技术又叫补料批式操作，即在批式发酵的基础上，在过程中根据需要进行营养物的补充。显然这里要研究的是补什么营养物及以什么速率来补充。具体在应用中分为无反馈补料及反馈补料。

无反馈补料是在对过程代谢进行研究的基础上制定一定的"轨迹"曲线进行补料。

反馈补料是依据过程在线量测结果，特别是敏感量的变化情况，建立一定的控制模型决策补料流量。

在面包酵母发酵培养中应用轨迹曲线补糖，比起传统经验方法生物量对糖的得率提高20%以上，而且放罐菌浓度亦提高20%以上。

在青霉素发酵中应用控制模型进行补料，使得青霉素发酵单位提高30%左右。

例一：Shioya 对于 $q_p \sim \mu$ 关系有最大值关系的控制进行研究。设 q_p 与 μ 的关系为：

$$q_p=\begin{cases} a_1\mu+b_1 & \mu_{min}\leqslant\mu\leqslant\mu_c \\ -a_2\mu+b_2 & \mu_c<\mu\leqslant\mu_{max} \end{cases} \qquad (1E-30)$$

$$(1E-31)$$

则依据最大值原理(bang－bang control)分析得到获得最高放罐产物浓度应遵循的策略是：

$$\mu=\begin{cases} \mu_{max} & \text{当 } 0\leqslant t\leqslant t_c \\ \mu_c & \text{当 } t_c<t\leqslant t_f \end{cases} \qquad (1E-32)$$

$$(1E-33)$$

对于上述 $q_p \sim \mu$ 的关系

$$t_c=t_f-\ln(b_2/q_{p,max})/\mu_c \qquad (1E-34)$$

作者分析了基因工程酵母菌生产酸性磷酸酯酶(Apase)的过程。Apase 基因在30℃以下受抑制，而在30℃以上 MF_a1 启动子表达，产生 Apase，与前面分析的关系一样 q_p 与 μ 呈一具有最大值的关系。最佳的控制策略应是在培养初期控制低温使有较高的比生长速率，而在一定的时间变温使 $\mu=\mu_c$ 达到最高的 q_p，图1－19给出了计算与实验结果。

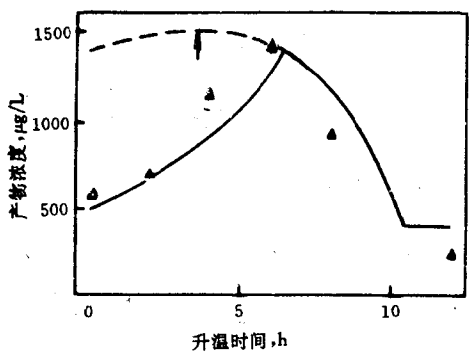


图1－19　升温时间与最终产物 Apase 浓度的关系

作者还分析了亮氨酸限制的赖氨酸产生过程，得到了同样的优化模式及结果。

例二：C. Curless 等人研究了基因工程 E. coli K－12 生产人淋巴因子的过程优化。作者采用两级循环培养过程。这一过程的启动子是 λ_c1857 基因，在30℃受到阻遏，而在42℃去掉阻遏。常规这一过程是用一个罐，并在过程中间升温来实现的。作者考虑连续过程的优越性，尝试了两级分开培养，第一级用流加培养生产足够的生物量，第二级用流加技术培养得到高产物表达量。培养模式示于图1－20。

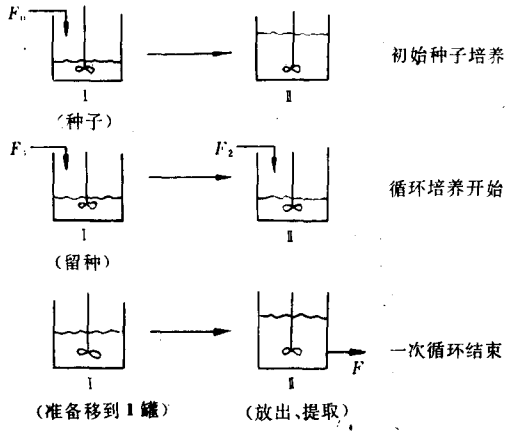


图 1－20　两级循环培养模式

在预备试验中作者用连续培养研究了第一阶段培养的比生长速率对产物量的影响，得到最佳比生长速率为 0.13h^{-1}，从而为以后的流加速率设计提供了依据。

在预备试验中筛选了初始培养基、诱导前及诱导后补料的组成。

批式培养中还得到在诱导以后 4～6h 产物达到最高浓度。

这样，在预备实验的基础上，采用指数流加 $F=V_0\mu\exp(\mu t)$，两级循环培养，经过 30 次培养操作仍然正常，设备容积生产能力比简单批式提高一倍。

以上的例子说明生物培养过程的优化是一个很有潜力的领域，随着生物技术、计算技术的发展，过程的优化会取得迅速进展。

符　号　表

D	稀释率	S	基质浓度
d	直径	t	时间
P	产物浓度	V	体积
p	发酵罐生产能力	x	菌体浓度
q	比生成(消耗)速率	Y	得率系数
$R.Q$	呼吸商	μ	菌体的比生长速率

参考文献

1　Wang D I C, et al. Fermentation and Enzyme Technology, John Wiley and Sons, 1979

2　Mizrahi A and van Wezel A L. Advances in Biotechnological Processes, vol. 1, 1983

3　Moser A, Bioprocess Technology, Springer－Verlag, 1988

4　Bailey J E and Ollis D F. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw Hill Bool Company, 1986

5　陈甘棠等．化学反应工程．北京：化学工业出版社

6　Curless C, et al. Biotech. and Bioeng., 1991, 38(9):1082～1090

7　第五届国际计算机在发酵工程中应用学术会议论文集．美国：Keystone, 1992

8　李元广等．中国第三届生物技术过程模型化与控制学术讨论会论文集．北京：1992

第二章　动物细胞大规模培养和专用生物反应器

张元兴　陈志宏　陈因良

（华东化工学院生化工程研究所，上海，200237）

动物细胞的体外培养，能够生产许多有价值的生物制品，包括重要的疫苗、高效的治疗药物和灵敏的诊断试剂。由于医疗卫生事业和农业的发展，这些生物制品的市场正在迅速扩大，它们的大规模生产已成为迫切需要。在国内，通过动物细胞培养，乙肝疫苗、单克隆抗体、组织型血纤维溶酶原激活剂（tPA）、尿激酶、乙脑疫苗、狂犬疫苗、鸡瘟疫苗、鱼疫苗等的生产正在放大规模，具有良好的投产前景。这类生物制品的研制，必须解决3个相关过程和关键技术问题，即（1）基因工程和细胞工程的发展；（2）大规模动物细胞培养技术和生物反应器的开发；（3）产品的分离浓缩和提纯技术的提高。本文讨论大规模动物细胞培养技术和生物反应器的开发。

第一节　常用的培养方法

体外培养的动物细胞有两种类型。一种是非贴壁依赖性细胞，来源于血液、淋巴组织的细胞，许多肿瘤细胞（包括杂交瘤细胞）和某些转化细胞属于这一类型，可采用类似微生物培养的方法进行悬浮培养。另一种是贴壁依赖性细胞，大多数动物细胞，包括非淋巴组织的细胞和许多异倍体细胞属于这一类型，它们需要附着于带适量正电荷的固体或半固体表面上生长。

一、贴壁培养

成纤维细胞和上皮细胞等贴壁依赖性细胞在培养中要贴附于壁上，原来是圆形的细胞一经贴壁就迅速铺展，然后开始有丝分裂，并很快进入对数生长期。一般在数天后铺满生长表面，形成致密的细胞单层。大多数动物细胞属于贴壁依赖性细胞，如HeLa、Vero、BHK、CHO等都是细胞工作者常用的细胞系。

培养贴壁依赖性细胞，最初采用滚瓶系统，其结构简单、投资少、技术成熟、重演性好，放大只是简单地增加滚瓶数。但是滚瓶系统劳动强度大，单位体积提供细胞生长的表面积小，占用空间大，按体积计算细胞产率低，监测和控制环境条件受到限制。为了克服这些不利因素，Van Wezel[1]在1967年开发了微载体系统培养贴壁依赖性细胞。微载体是直径为60～250μm的微珠。采用微载体系统培养动物细胞[2,3,4]，细胞贴附于微载体上，悬浮于培养基中，逐渐生长成单层。这种模式把单层培养和悬浮培养融汇在一起，具有两种培养方法的优点：（1）表面积/体积比大。若1ml培养基中加入1mg Cytodex 1，表面积达5cm^2，足够(750～1000)×10^{6}个细胞生长所需的表面积。由于微载体的比表面积大，单位体积培养基细胞产率高。（2）微载体悬浮于培养基中，细胞生长环境均一，简化了这些环境因素的监测和控制。用简单显微镜能观察细

胞生长情况。(3)培养基利用率高。(4)采样重演性好。(5)收获过程不复杂。(6)放大较容易。(7)劳动强度小,占用空间小。由于微载体培养系统有许多优点,现已被广泛用于动物细胞的大量培养以生产各种生物制品。

影响微载体培养的特殊因素有微载体浓度、接种浓度和搅拌转速等。

二、悬浮培养

所谓悬浮培养,是指细胞在培养器中自由悬浮生长的过程。主要用于非贴壁依赖性细胞培养,如杂交瘤细胞等。动物细胞的悬浮培养是在微生物发酵的基础上发展起来的。由于动物细胞的特点(如没有细胞壁保护,不能耐受剧烈的搅拌和通气),因此在许多方面又与经典的发酵不同。对于小规模培养多采用转瓶或滚瓶培养,大规模培养多采用发酵罐式的细胞培养反应器。悬浮培养设备结构简单,可以借鉴微生物发酵的部分经验,放大效应小。但是悬浮培养的细胞密度较低,转化细胞悬浮培养有潜在致癌危险,培养病毒易失去病毒标记而降低免疫能力。此外贴壁依赖性动物细胞不能悬浮培养。

三、固定化培养

悬浮培养适用于非贴壁依赖性细胞,贴壁培养适用于贴壁依赖性细胞。除此之外,还有一种包埋培养,对两类细胞都适用,细胞生长的密度高,抗剪切力和抗污染能力强[5,6]。对非贴壁依赖性细胞常用海藻酸钙包埋,对贴壁依赖性细胞常用胶原包埋。

制备固定化细胞有不同的方法,各种方法的特点列于表 2-1。

表 2-1 动物细胞固定化各种方法的特点

	吸附	共价贴附	离子/共价交联	包埋	微囊
负载能力	低	低	高	高	高
机械保护	无	无	有	有	有
细胞活性	高	低	高	低	高
制　备	简单	复杂	简单	简单	复杂
扩散限制	无	无	有	有	有
细胞泄漏	有	无	无	无	无

1. 吸附

选择适当的条件,将细胞和支持物混合,细胞便贴附在支持物的表面。此方法的缺点主要是负荷能力低,有细胞脱落的危险。由于细胞位于支持物表面,细胞没有抗机械剪切的保护,但扩散限制小。吸附的一个特例就是微载体培养贴壁依赖性细胞。

2. 共价贴附

细胞和支持物通过化学键结合,减少了细胞泄漏。但需化学试剂处理,这对细胞活性不利。由于是贴附,扩散限制小,但细胞不能得到保护。

3. 离子/共价交联

如果用聚合物(聚胺等)处理细胞悬液,则会在细胞之间形成桥使之絮结。通常细胞活性高,但机械稳定性差,易发生细胞泄漏。用戊二醛处理可以增强机械稳定性,防止细胞泄漏。共价交联试剂往往导致一些细胞死亡。离子交联和共价交联类似于包埋,往往产生扩散限制。

4. 微囊

1984 年 Lim[5]等发展了一种微囊化方法。它是在液体状态和生理条件下制备的,对细胞

的生长条件改变不大，因此使包埋的细胞能够成活，也能培养生长。微囊化后，降低了培养时对细胞的剪切力。微囊里面处于一种微小的培养环境，与液体培养差不多，细胞生长良好。微囊化培养能提供很高的细胞密度，使得产物浓度增加，纯度提高。

5. 包埋

此法步骤简单，条件温和，细胞和高聚物或单体混合，随着凝胶的形成，细胞嵌入到高聚物的网络中。由于有一系列高聚物可采用，通常可以选择合适的系统使细胞处于活性状态。这种方法负荷量大，细胞泄漏减少，高聚物网络能保护细胞抗机械剪切。当然，它亦存在一些缺点，如扩散限制，并非所有细胞都能处于最佳基质浓度，而且大分子基质不能渗透高聚物网络，往往有一些物质被排斥在外。

第二节　动物细胞培养的操作方式

无论是贴壁细胞还是悬浮细胞，就操作方式而言，深层培养可分为分批式、流加式、半连续式、连续式和灌注式 5 种方式。

不同的操作方式，具有不同的特征。下面分别对这 5 种操作方式进行介绍。

一、分批式操作

分批式培养是指将细胞和培养液一次性装入反应器内，进行培养，细胞不断生长，产物也不断形成，经过一段时间反应后，将整个反应系取出。

对于分批式操作，细胞所处的环境时刻都在发生变化，不能使细胞自始至终处于最优条件下，在这个意义上它并不是一种好的操作方式。但由于其操作简便，容易掌握，因而又是最常用的操作方式。

细胞分批式培养的生长曲线如图 2－1 所示。分批式培养过程中，细胞的生长可分为延迟期、对数生长期、减速期、平稳期和衰退期 5 个阶段。

延迟期是指细胞接种到细胞分裂繁殖这段时间。延迟期的长短依环境条件的不同而异，且受种子细胞本身条件影响。细胞的延迟期是其分裂繁殖前的准备时间。一方面，细胞逐渐适应新的环境条件，另一方面，又不断积累细胞分裂繁殖所必需的某些活性物质，使之达到一定浓度。选用生长比较旺盛的对数生长期细胞作为种子细胞，可缩短延迟期。

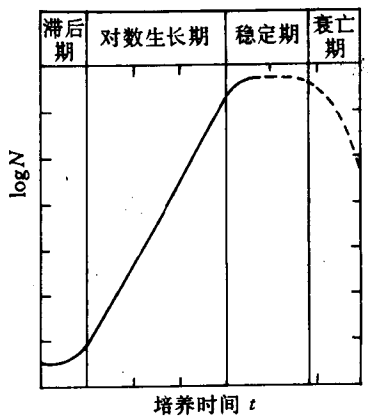


图 2－1　分批式培养细胞生长曲线

细胞内的准备一结束，细胞便开始迅速繁殖，进入对数生长期。此时细胞随时间呈指数函数形式增长。

细胞通过对数生长期迅速生长繁殖之后，由于环境条件的不断变化，如营养物质不足、抑制物积累、细胞生长空间减少等原因，细胞经过减速期逐渐进入平稳期，细胞生长和代谢减慢，细胞数基本维持不变。

在经过平稳期之后，由于环境条件恶化，有时也可能由于细胞本身遗传特性的改变，细胞逐渐进入衰退期而不断死亡，或由于细胞内某种酶的作用而使细胞发生自溶。

二、流加式操作[7]

流加式操作是指先将一定量的培养液装入反应器，在适宜条件下接种细胞，进行培养，细胞不断生长，产物也不断形成。随着细胞对营养物质的不断消耗，新的营养成分不断补充至反应器内，使细胞进一步生长代谢，到反应终止时取出整个反应系。

流加操作的特点就是能够调节培养环境中营养物质的浓度。一方面，它可以避免某种营养成分的初始浓度过高而出现底物抑制现象，另一方面，能防止某些限制性营养成分在培养过程中被耗尽而影响细胞的生长和产物的形成，这是流加式操作与分批式操作的明显不同。此外，由于新鲜培养液的加入，整个过程中反应体积是变化的，这也是它的一个重要特征。

根据不同情况，存在不同的流加方式。从控制角度可分为无反馈控制流加和有反馈控制流加两种。无反馈控制流加包括定流量流加和间断流加等。有反馈控制流加，一般是连续或间断地测定系统中限制性营养物质的浓度，并以此为控制指标，来调节流加速率或流加液中营养物质的浓度等。

最常见的流加物质是葡萄糖、谷氨酰胺等能源和碳源物质。

三、半连续式操作

半连续培养又称为反复分批式培养或换液培养，是指在分批式操作的基础上，不全部取出反应系，剩余部分重新补充新的营养成分，再按分批式操作的方式进行培养，这是反应器内培养液的总体积保持不变的操作方式。

图 2－2 为曲型的半连续培养悬浮细胞(换液时细胞一起换出)时的生长曲线。这种操作方式可以反复收获培养液，对于培养基因工程动物细胞分泌有用产物或病毒培养过程比较实用，尤其是微载体培养系统更是如此。例如，采用微载体系统培养基因工程 rCHO 细胞，待细胞长满微载体后，可反复收获细胞分泌的乙肝表面抗原(HBsAg)制备乙肝疫苗。

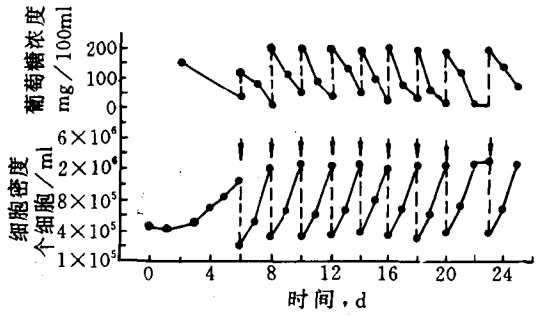


图 2－2　半连续式培养 HeLa 细胞生长曲线

四、连续操作[8]

连续式操作，是指将细胞种子和培养液一起加入反应器内进行培养，一方面新鲜培养液不

断加入反应器内，另一方面又将反应液连续不断地取出，使反应条件处于一种恒定状态。

与分批式操作和半连续式操作不同，连续培养可以控制细胞所处的环境条件长时间的稳定，因此，可以使细胞维持在优化状态下，促进细胞生长和产物形成。此外，对于细胞的生理或代谢规律的研究，连续培养是一种重要的手段。

连续培养过程可以连续不断地收获产物，并能提高细胞密度，在生产中被应用于培养非贴壁依赖性细胞。如英国 Celltech 公司采用连续培养杂交瘤细胞的方法，连续不断地生产单克隆抗体。

五、灌注培养

灌注式操作是指细胞接种后进行培养，一方面新鲜培养基不断加入反应器，一方面又将反应液连续不断地取出，但细胞留在反应器内，使细胞处于一种不断的营养状态。

当高密度培养动物细胞时，必须确保补充给细胞以足够的营养以及去除有毒的代谢废物。在分批培养中，可以采用取出部分用过的培养基和加入新鲜的培养基的办法来实现。这种分批部分换液办法的缺点在于当细胞密度达到一定量时，废代谢物的浓度可能在换液前就达到了产生抑制作用的程度。降低废代谢产物的有效的方法就是用新鲜的培养基进行灌注。通过调节灌注速度，可以把培养过程保持在稳定的、废代谢物低于抑制水平的状态下。一般在分批培养中细胞密度为$(2\sim4)\times10^6$/ml，在灌注系统中可达到$(2\sim5)\times10^7$/ml。灌注技术已经应用于许多不同的培养系统中，规模分别为几十升至几百升。

表 2－2　不同培养工艺对 tPA 产量和活性的影响

培　养　工　艺	分　批	半　连　续	灌　注
纯化得率，%	8	21	65
纯化物质的相对产量	1	1.33	7.74
比活性，IU/mg tPA	114.4	391.3	392.6

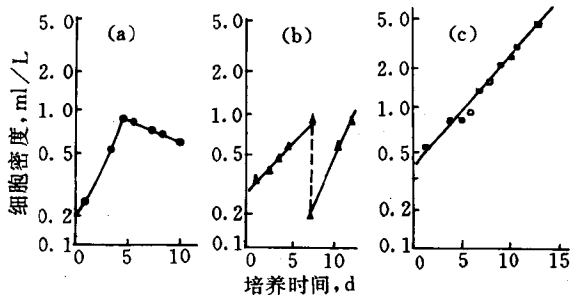


图 3－3　分批和灌注培养对细胞生长的影响

(a)分批；(b)半连续；(c)灌注

采用灌注技术其优越性不仅在于大大提高了细胞生长密度，而且有助于产物的表达和纯化。以基因工程 CHO 细胞生产人组织型血纤维溶酶原激活剂(tPA)为例[9]。tPA 是培养过程中细胞分泌的产物，采用长时间的培养周期是经济和合理的工艺手段。在分批培养中，培养基中的 tPA 长时间处于培养温度(37℃)下，可能产生包括降解、聚合等多种形式的变化，影响得

率和生物活性。当采用连续灌注工艺时，作为产物的tPA在罐内的停留时间大大缩短，一般可由分批培养时的数天缩短至数小时，并且可以在灌注系统中配有冷藏罐，把取出的上清液立即贮存在4℃左右的低温贮罐中，使tPA的生物活性得到保护，产物的数量和质量都超过分批培养工艺(见图2－3和表2－2)。

第三节　细胞培养过程的放大

“放大”通常是指生产规模的增大和生产能力的增加。放大的目的是在更大的规模重现某个过程并实现预期的实验结果。

生产的规模取决于该产品的需求量和生产效率，往往可以相差几个数量级。如某些诊断试剂可以在实验室规模的每天10～20L装置中生产，而某些治疗药物可能要在每天10000L以上的规模生产。目前工业规模的连续或半连续系统，一般为每天收获25～500L，分批反应器容积为500～5000L，操作周期通常为1～3周。近年来，某些病毒疫苗已用微载体系统在500L以上工作容积的搅拌反应器中生产。细胞在搅拌反应器中的悬浮培养已达3000L工作容积，而干扰素的生产规模已达到8000L。

动物细胞培养由实验室建立的细胞株到反应器的大规模培养一般经历5个不同的阶段(表2－3)。第一阶段是筛选和开发能表达所需产物的细胞系。这一阶段通常涉及到重组DNA和细胞融合技术以期获得一个有较高生长速率、较强的抗诱变性能、很高的专一表达水平和生产速率的细胞株。第二阶段是在方瓶或转瓶中确定该细胞系对营养物质和环境的要求。放大的过程从第三阶段开始。这一阶段，细胞培养转入生物反应器中进行，最理想的是采用由生产规模的反应器缩小的台式反应器，通常为1～5L。对细胞的营养物质要求和环境条件参数要进行验证和修正，确定最佳的操作方式(如分批、流加、半连续、连续或灌注操作)。第四阶段在中试规模进一步根据生产的实际条件和可能性，确定过程的控制方案，根据细胞株的实际情况寻求过程的优化方案，对培养的环境作进一步的调整。这一阶段是把实验室的结果引向生产水平过程中所必需的，其中包含有许多在转入生产规模时所必须解决的工程问题。第五阶段是扩大到生产规模，所用的反应器是生产规模的，但是还必须与中试过程密切结合，在生产规模中尚需解决的问题可以和中试车间的试验相结合，以最终实现由实验室研究转入工业规模的生产。

表2－3　细胞培养放大过程的5个主要阶段

步　骤	装　备	培养规模
筛选细胞系	细胞/组织培养实验室	98孔板，方瓶
确定培养条件	细胞/组织培养实验室	方瓶、滚瓶、转瓶
产物表达的优化	生物工程实验室，细胞培养实验室	台式生物反应器
为放大修正条件	实验室，中试车间	台式和中试生物反应器
放大生产	生产车间，中试车间	生产用反应器，中试反应器

目前，以下6个主要问题阻碍了大规模细胞培养技术的广泛应用。

一、培养基组成

血清的作用在于向细胞提供激素(生化因子)、转移蛋白和其它营养物质。目前血清是培养

基中不可缺少的组分，并成为达到最优化和经济性目标的障碍。降低血清用量和采用无血清培养基成为研究的热点。这是基于以下的考虑：

(1) 血清中含有广泛的微量组分，对细胞生长有相当大的作用，但对其存在的作用至今还未充分确定；

(2) 对通过细胞培养获得产物的过程，血清的存在是纯化的主要障碍，甚至难以使产物形成医药产品；

(3) 血清常受病毒污染，其中许多对细胞培养无害，但增加了未知因素，为操作者不能控制；

(4) 血清是培养基成本的主要部分；

(5) 血清不仅有生长促进活力，而且有生长抑制活力；

(6) 实验和生产过程的标准化困难。

二、限制细胞生长的因素

在动物细胞培养系统中有许多因素限制了细胞生长。与微生物发酵相比，动物细胞培养能达到的细胞密度比较低。根据不同的细胞类型、培养系统和培养基组成，其范围为每毫升(0.5～5)$\times 10^6$ 个细胞。限制细胞密度的主要因素是培养条件和最优控制。两个关键是细胞代谢物(乳酸、氨等)毒害和营养物的耗竭。此外接种的最小细胞密度也可能是一个限制因素。细胞培养物通过生产刺激它们自身生长的因子来调节它们的培养环境，在培养贴壁生长细胞时，细胞生长还受限制于可利用的生长表面积。

代谢产物的毒害和培养基的耗竭而引起的生长限制，可以通过过程调控来解决，即采用灌注系统或换液、流加等办法来解决。灌注是一个最好的方法，既可用于单层培养系统，也可用于微载体和悬浮培养系统。采用这种方法，细胞密度可以达到 10×10^6/ml。与生长表面积有关的问题可以通过开发高比表面积细胞培养系统来加以克服(如从滚瓶系统、多层平板或填充床的发酵罐，到中空纤维系统以及微载体系统)。这些最新的培养系统已经应用于大规模细胞培养，使之可以有很好的温度、pH 值、氧和营养物的控制，并在悬浮条件下保持细胞的均相培养。

三、污染的控制

动物细胞培养物可能被各种微生物病毒污染。这些污染物的来源包括细胞种子、血清、试剂、实验室环境和操作人员。

污染的控制起始于细胞种子及其保存。对冻存细胞必须严格测试证明其无污染。某些组分如血清或胰酶(用在贴壁生长细胞的传代培养)可能被支原体或病毒污染。有些污染物难以被过滤除菌除去，故可高温灭菌的培养基应运而生。实验室或中试车间需要有快速、灵敏和价廉的测试方法检定支原体和病毒等常见的细胞培养污染物。

在生产过程或实验室空间中，完全没有微生物的污染是不可能的，这需通过改进设备的设计消除这些污染源，其中反应器的设计是关键。实验人员也常是重要的污染源，无菌操作技术的良好训练是污染控制的基础。

四、产物表达的控制

动物细胞培养的产物有两大类。一是细胞本身，另一是由细胞分泌的某些产物。由细胞分泌的产物可分为 3 类：(1)天然产物，如淋巴因子、激素、病毒等；(2)基因工程产物，如病毒亚单位蛋白；(3)融合细胞产物，如单克隆抗体。

掌握细胞生长的优化条件和确定产物表达的培养环境的各物理参数是放大的基础。但是，

细胞生长的最优条件并不一定是产物表达的最优条件。产物常常在细胞的衰退期得到最佳表达，而不是在对数生长期。目前在平稳期或衰退期控制基因表达仍很困难。

产物表达的问题主要是生物学方面的，一旦更清楚地了解了其生物学情况，就能开发出所需要的硬件。这些问题的生物学解决办法有：

(1) 建立能更高密度生长或对生长条件要求不太严格的细胞系；

(2) 开发能大量生产目标产品的细胞系；

(3) 有可能通过诱导分裂或诱导存在质粒的表达使细胞具有高水平的产物表达；

(4) 开发更好的克隆载体。这些载体应具有高水平表达产物的特性，特别是有利于目标产物的表达。

五、硬件和过程设计参数

与大规模动物细胞培养有关的反应器和设备问题可归纳为：

(1) 细胞培养环境的控制(温度、溶解氧、二氧化碳、pH 值、渗透压)；

(2) 污染的排除(阀门设计、流体转移系统、培养基灭菌)；

(3) 遏制潜在的生物毒害物的扩散(反应器的取样、产物的收获)；

(4) 为贴壁生长细胞提供足够的表面积(固体介质的性质、培养系统的比表面积)；

(5) 在培养中对剪切力的控制(搅拌、通气、细胞收获)。

充分的氧传递可能是所有培养反应器放大中的问题。在微载体上生长的贴壁细胞或悬浮细胞可用可消毒电极来监控。对于动物细胞系统，过程控制更复杂。只有控制很窄的 pH 值、渗透压、温度和溶解气体浓度的范围，才能使这些细胞保持在原有组织相似的生长环境。

培养贴壁细胞的表面积可以通过中空纤维和微载体技术得到大大增加。从纤维上收获细胞的方法还需要进一步地研究。对于一种细胞，选定了合适的微载体，则放大的问题就在于廉价培养介质、它们的灭菌以及在细胞培养中重复使用。

悬浮在反应器中的细胞还对剪切敏感。在使用搅拌反应器时，贴附有贴壁细胞的微载体的碰撞是一个不可避免的问题。通过对反应器内几何尺寸的最优化，可在提供足够宏观混合的同时减小机械剪切力。许多反应器采用大桨叶、船帆桨或温和的低剪切流体循环系统，某些动物细胞甚至可以在原先设计用于微生物培养的搅拌反应器中培养。

在细胞收获和细胞再循环设备中，往往产生快速剪切，造成动物细胞的死亡和机械破碎。从反应器优化的角度看，把动物细胞再循环至反应器或在灌注新鲜培养基时把细胞保留在反应器中的工艺或技术，可以大大地改善产物的活性、浓度和反应器的生产率。

六、产物收获

从动物细胞培养中收获产物的问题与产品的类型有关。目前产物大多数是细胞或由细胞分泌的蛋白质，为得到大量的细胞所需解决的问题包括：

(1) 开发细胞培养方法和工艺，提高细胞密度，使收获细胞容易，特别是贴壁生长的细胞；

(2) 冻存好细胞，确保细胞种子的重复性。

与蛋白质产物收获有关的问题包括：

(1) 在生长培养基中存在污染产物的血清蛋白质；

(2) 由培养细胞表达的细胞产物浓度很低；

(3) 在培养条件下产物的不稳定性。

结果，产物常常小于培养基中总蛋白质量的 1%。浓缩和纯化这些产物需要许多步骤，产

物收率常常很低。

解决蛋白质纯化的方法包括：

(1) 使用无血清(甚至无蛋白)培养基使“污染”蛋白量最少；

(2) 开发产物特异的亲和柱；

(3) 开发筛选技术以快速地确定产生大量产物的细胞克隆；

(4) 开发在无血清培养基中稳定蛋白质产物以及抑制细胞内、外蛋白酶活性的方法；

(5) 采用中空纤维、微囊或其它合适的技术分离或浓缩产物。

纯化的步骤不仅必须效率高，而且尽量不在产物中加入不需要的组分。

第四节　动物细胞培养生物反应器

一台生物反应器的设计必须满足如下要求：

(1) 生物因素：必须有很好的生物相容性，能很好地模拟细胞在动物体内的生长环境；

(2) 化学因素：必须提供足够的停留时间，完成所需要的转化率，符合过程反应动力学的要求；

(3) 传质因素：对于非均相反应，反应过程往往被反应底物的扩散速率制约，而不是反应动力学所控制，因此必须满足物质传递的要求；

(4) 传热因素：有能力除去和加入反应过程的热量，无过热点；

(5) 安全因素：有毒害的反应物和产物的隔离，有优良的防污染性能；

(6) 操作因素：便于操作和维修。

为了满足这些相互联系而且常常是相反的因素的需要，生物反应器的设计成为一个复杂和困难的任务。

70年代以来，细胞用生物反应器有很大的发展，种类越来越多，规模越来越大。其种类大致有：塑料袋增殖器、填充床增殖器、多层板增殖器、螺旋膜增殖器、管式螺旋增殖器、陶质矩形通道蜂窝状增殖器、流化床反应器、中空纤维及其它膜式反应器、搅拌反应器、空气提升式反应器等。搅拌反应器的搅拌型式大致上有：桨式搅拌器、棒式搅拌器、船舶推进桨搅拌器、倾斜桨叶搅拌器、船帆形搅拌器、往复振动锥孔筛板搅拌器、笼式通气搅拌器、以及华东化工学院开发的双层笼式通气搅拌器等。随着市场对细胞培养产物需求的增加，国外许多公司设计并生产了许多大型细胞培养用反应器，如 Celltech 公司建立了 10000L 规模的生物反应器培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体，Sumitomo 公司建立了 8000L 反应器生产 tPA，Wellcome 公司建立了 8000L 搅拌反应器生产病毒疫苗、干扰素和其它生物制品，加拿大最近从瑞士 Bioengineering 公司购进 4 台 2000L 反应器生产脊髓灰质炎疫苗。

一、生物反应器的种类

1. 悬浮培养用[10]

有空气提升式[11](如英国 Celltech 公司和瑞士 Chemap 公司)、搅拌槽[12,13](如美国 NBS 公司和德国 GBF)、中空纤维管[14](如美国 Bioresponse 和 Invitron 公司)及陶质矩形通道蜂窝状生物反应器[15]。

2. 贴壁培养用

有搅拌槽(微载体系统)、中空纤维管和陶质矩形通道蜂窝状生物反应器。

3. 包埋培养用

有流化床[16](如美国 Bellco 公司)、固定床[17]生物反应器。

某些生物反应器的主要特性列于表 2－4[18]。

表 2－4　某些生物反应器的主要特性

	低　密　度		高　密　度	
反应器类别	搅拌槽、气体提升式	细胞截留的搅拌槽	多孔珠、微囊(在填充床/流化床中)	中空纤维、陶质组件
通常细胞密度，ml^{-1}	$(3\sim4)\times10^8$	3×10^7	$(1\sim3)\times10^8$	1×10^8
细胞的剪切保护	有(需良好设计)	有(需良好设计)	有	有
下游处理	困难	困难	容易	很容易
对细胞检测和控制	直接	直接	有时直接	间接
扩散限制	无	无	有	有
放大	容易	容易	困难	困难
生产率	低	高	很高	很高
过程控制	容易	容易	稍难	困难
罐养模式	悬浮	悬浮	贴壁、结团	贴壁、结团
细胞生长速率	高	低	很低	很低
产品	细胞蛋白、疫苗、病毒感染蛋白	细胞蛋白、疫苗、病毒感染蛋白	细胞蛋白、疫苗	细胞蛋白

二、气升式细胞培养生物反应器[19]

气升式反应器的基本原理如图 2－4 所示。气体混合物从底部的喷射管进入反应器的中央导流管，使得中央导流管中的液体密度低于外部区域，从而形成循环。空气提升式生物反应器主要有两种构型。一种是内循环式，一种是外循环式。动物细胞培养一般采用内循环式，但是也有的采用外循环式。器内装有环形管作为气体喷射器，孔的设计要保证在控制的气速范围内产生的气泡直径为 1～20mm，空气流速一般控制在 0.01～0.06VVM，反应器高径比一般为 3∶1～12∶1。

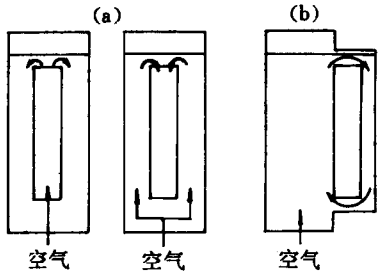


图 2－4　气升式反应器原理
(a)内循环式；(b)外循环式

气升式生物反应器与搅拌生物反应器相比，产生的湍动温和而均匀，剪切力相当小，器内没有机械运动部件，因而细胞损伤率比较低；直接喷射空气供氧，氧传递速率高；液体循环量大，使细胞和营养成分能均匀地分布于培养基中。

英国 Celltech 公司首先采用空气提升式生物反应器培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体。1980 年为 10L 规模，1984 年放大到 100L 和 200L 规模，以后又放大到 1000L 和 2000L，到 1990 年放大到 10000L。逐级放大的主要问题是控制通气速率和混合性能，以达到细胞、氧和营养物质均匀分布。培养工艺是用阶式系统，先在 10L 反应器中培养细胞 2～3 天，再逐级转

移到 100L 和 1000L。从 10L 到 1000L 培养，共需 17 天时间，生产单克隆抗体 100g。

在气升式反应器中，溶氧的控制可以通过自动调节进入空气的速率来实现。pH 值可通过在进气中加入二氧化碳或加入氢氧化钠来控制。在低血清培养和小通气量下，一般产生泡沫不多，如果必要可采用专门消泡剂控制。通过无菌取样，计数细胞可以对细胞生长进行监测，亦可通过测定氧消耗等方法对细胞生长进行间接测定。

表 2－5　气升式反应器和传统培养方法的抗体产率比较

细胞系	抗体类型	抗体产量，mg/L			气升式/传统方法
		培养瓶	滚　瓶	气升式①	
1	IgG	14	20	86	5.1
2	IgM	70	127	295	3.0
3	IgG	9	10	73	7.7
4	IgG	28	30	100	3.4
5	IgG	60	76	260	3.8
6	IgM	20	25	112	5.0
7	IgG	30	38	200	5.9
8	IgG	120	100	350	3.2
					平均　4.6

①1～4 为 1000L 规模，5～8 为 100L 规模。

抗体的合成大多数处于平稳期和衰退期。在持续 300h 培养中产生了 200g 抗体。根据细胞系的不同，生产周期在 140～400h 之间，倍增时间和最大细胞密度分别为 11～36h 和 1.0～4.6×10^6/ml，抗体浓度在 40～500mg/L 之间。在简单培养系统中(如培养瓶和滚瓶中)抗体浓度在 10～100mg/L 之间，在培养罐中浓度之所以得以提高是过程优化的结果，尤其是对培养基的设计和主要环境参数的控制。表 2－5 列出了 8 种细胞的有关培养数据。可以看出，同传统的方法(培养瓶，滚瓶)相比，气升式反应器的抗体产量平均提高 4.6 倍。

三、中空纤维管生物反应器

中空纤维管生物反应器(图 2－5)用途较广，既可培养悬浮生长的细胞，又可培养贴壁依赖性细胞，细胞密度最高可达 10^9/ml 数量级。如果控制系统不受污染，能长期运转。已用这种反应器培养过的细胞型和生产的分泌产物，如表 2－6。

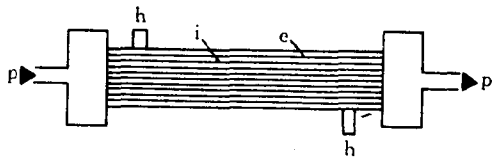
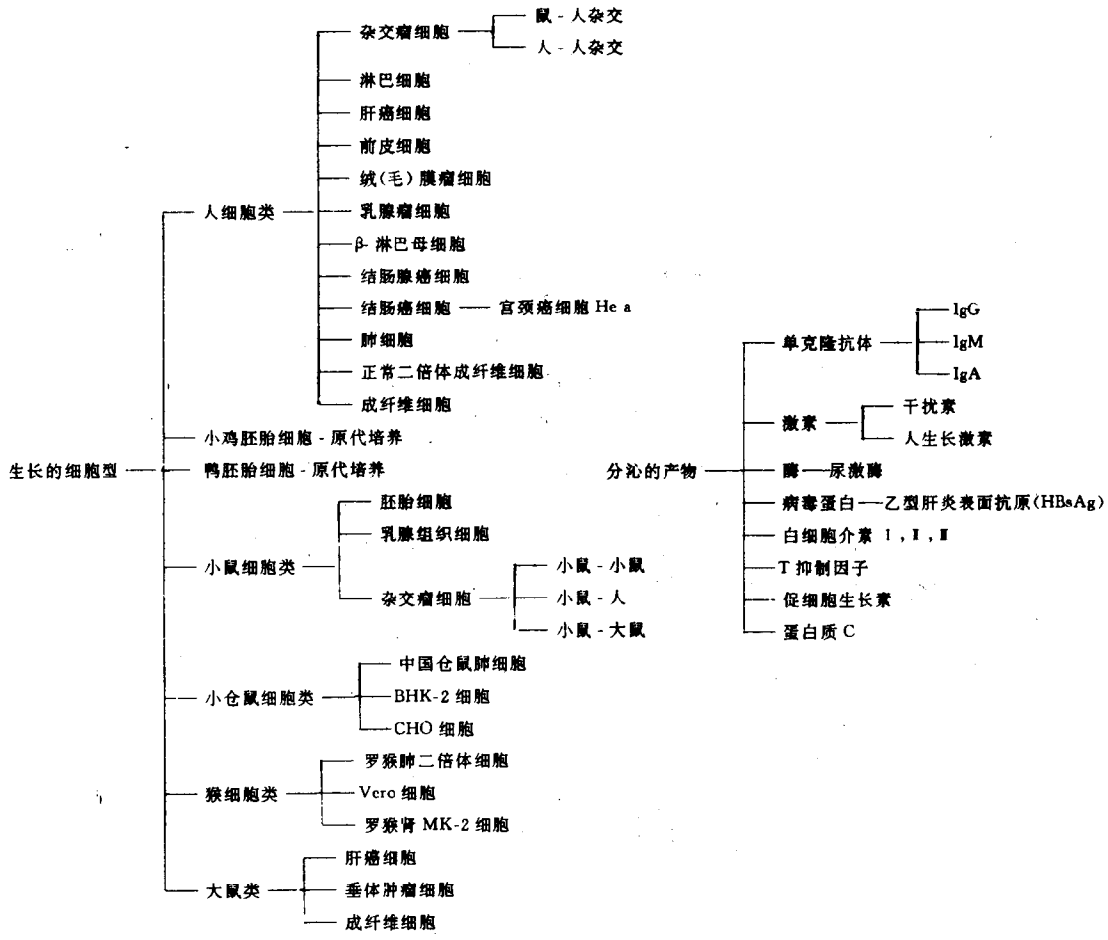


图 2－5　中空纤维反应器示意图
p—灌注液；h—收获液；i—管内；e—管外

最初开发的中空纤维管系统，是将纤维管束纵向布置，培养基、种细胞由底部注入，从顶端排出，纤维管间通气体。这种布置方法有很大的缺点，培养基成分和代谢产物沿培养基流动方向产生浓度梯度，使细胞经历的环境随培养基的流过距离而变，致使细胞在纤维管中生长不均，培养贴壁细胞时不能扩展成单层。针对这一缺点，新开发出把纤维管束横放成平板式浅床，床层深度 3～6 层纤维管，将若干层浅层床组合在一个容器内。为了使培养基分布均匀，在床层底部引进培养基时，先通过一 2μm 微孔不锈钢烧结板分布器，再灌注到床层中。在床层顶部也

装置一 20μm 微孔不锈钢烧结板分布器，防止排出的培养基返混。另一种保持培养基均匀分布的方法是在床两端交替灌注新培养基。Endotronics 近年来对中空纤维管生物反应器作了新的改进，在反应器筒体外添置一膨胀室，用管路与筒体相连，形成一连通管，培养基由筒体内右边经膨胀室流到筒体内左边。经改进后，明显地改善了水力学条件，使培养基浓度梯度和细胞微环境差别减至最小，或者完全排除。中空纤维管生物反应器总的发展趋势是让细胞在管束外空间中生长，用这种方式，能获得更高的细胞密度。

表 2-6　在中空纤维管中生长的细胞型和分泌产物



中空纤维管生物反应器已进入工业生产，主要用于培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体。Bioresponse 和 Invitron 即是采用这种生物反应器生产单克隆抗体。

四、通气搅拌生物反应器

各种搅拌生物反应器的主要区别在于搅拌器的结构。根据动物细胞培养的特点，要求搅拌器转动时产生的剪切力小，混合性能好。环绕这个要求，已开发了不少型式的搅拌器。在已开发的各种型式的搅拌器中，New Brunswick Scientific Co(NBS)开发的笼式通气搅拌器基本上

能符合上述要求，于 1987 年前后作为商品推向国际市场，该装置如图 2－6 所示。安装有这类装置的细胞培养用生物反应器有 1.5L、2.5L、5L 的 CelliGen 和 15L、30L 以至 1000L 的 Microlift。作为对最初设计的笼式通气搅拌装置的重大改进，在 NBS 装置中分别为笼式的通气腔和笼式的消泡腔。气液交换在由 200 目不锈钢丝网制成的通气腔内实现。在鼓泡通气过程中所采用的泡沫经管道进入液面上部的由 200 目不锈钢丝网制成的笼式消泡腔内，泡沫经丝网破碎分成气、液两部分，达到深层通气而不产生泡沫的目的。在细胞生长期，搅拌器转速一般保持在 30～60r/min 范围内。当 3 个导流筒随搅拌同步转动时，由于离心力的作用，搅拌器中心管内产生负压，迫使搅拌器外培养基流入中心管，沿管螺旋上升，再从三导流筒口排出，绕搅拌器外缘螺旋下降，培养基和细胞反复循环，反应器内流体混合相当好。

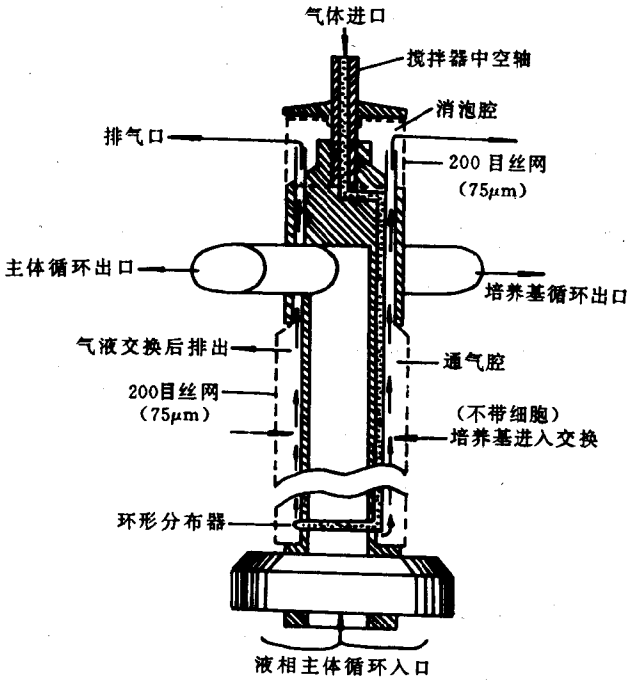


图 2－6　CelliGen 笼式通气搅拌器

搅拌器运转时，产生的剪切力有多大？经用热线风速仪测定 2.5L 和 5L 罐的时均速度和脉动速度分布，两种尺寸罐的两种速度分布线相似。从 5L 罐的时均速度和脉动速度分布可以看出，除在导流筒转动平面处时均速度和脉动速度分布有较小梯度外，远离此平面的区域速度分布线相当平坦，速度梯度很小。由此可以预断，对比其它构型生物反应器来说，CelliGen 罐内剪切力是比较小的。我们曾在 1.5L、2.5LCelliGen 罐用微载体培养系统培养 Vero 细胞和乙脑病毒以及 CHO 细胞，都获得了满意的结果。实践说明，CelliGen 罐能满足微载体系统培养动物细胞的要求。

虽然 CelliGen 罐有许多优点，但经原理和实践分析发现，它的氧传递系数小，不能满足培养高密度细胞时的耗氧要求。针对这个缺点，华东化工学院在放大设计生物反应器时，将单层笼式通气搅拌器改为双层笼式通气搅拌器，以扩大丝网交换面积，使氧传递系数提高。研制的 20L 双层笼式通气搅拌器，与控制系统、管路系统、蒸汽灭菌系统组装成完整的动物细胞培养装置 CellCul－20 反应器，用于悬浮培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体和用于微载体培养 Vero 细胞和乙脑病毒，都取得了满意结果。

五、无泡搅拌反应器

无泡搅拌反应器是一种装有膜搅拌器的生物反应器。它采用多孔的疏水性塑料管装配成通气搅拌桨，具有良好的氧通透性，同时解决了通气和均相化的要求。这类反应器能提供动物细胞生长中所需的氧，产生的剪切力较小，在通气中不产生泡沫，已广泛应用于实验室研究和中试、工业生产。

膜由聚丙烯、硅橡胶或其它材料制成，加工成多孔的中空管。德国 GBF 就采用多孔塑料管(表 2－7)作为无泡搅拌反应器的通气搅拌器。

由通气试验证明，中空管以 2.6mm 外径最为合适。气体可由空气和二氧化碳或氧气和二氧化碳组成。

在中空管内的气体压力不能超过鼓泡压力即气泡在膜外表面出现的静止内压。对于不润湿的疏水膜，相对于水的气泡压力约在 1.3×10^{-3}MPa。加在管上的压力应比管内流动压力降和气泡压力的总和高出 10%。在那种情况下，就可以形成管外的气液界面层。

物质通过多孔膜的交换过程是由气液之间的浓度所引起的。在很高的细胞密度时，可能产生氧和二氧化碳的相对流动。氧由膜的内壁向液相扩散，二氧化碳则由液相向膜的内壁扩散。膜周围的液相可以认为是均相混合，气相的浓度则由其位置而定。对于液体，界面层的更新受膜的运动速度影响；对于气体，气体的质量流速决定了孔内的交换过程和沿着中空管的内部浓度分布。

总的传递物质的量取决于每一个液体体积所用的膜的表面，即取决于单位体积所有的中空管长度。

膜材料不能有任何细胞毒害性并能够耐某些营养成份如血清和氨基酸的侵蚀。在膜的表面不能覆有细胞和其它沉淀物而影响气体传递。膜材料的可用性只能通过实际的细胞培养实验测定。

表 2－7　多孔中空管数据

内　径　1.8mm		外　径　2.6mm	
孔隙率	75%	外部比表面积	81.7cm²/m
平均孔径	0.3μm	内部比表面积	56.5cm²/m
管内爆破压力	0.15MPa	外部比体积	5.3cm³/m
爆破压力	0.65MPa	内部比体积	2.5cm³/m

六、动物细胞反应器的控制

在微生物发酵系统中，为达到一定的溶氧水平可以通过增加搅拌转速、增加通气量以及提高培养罐压力以提高氧分压来实现。由动物细胞的特性所决定，细胞培养不能沿用微生物发酵过程中常用的手段。一种安全而有效的方法是改变通入培养罐内气体中的氧气和氮气的比例来实现控制溶氧值的目的。同样，在微生物发酵系统中借助于加入酸或碱性物质来调节培养液 pH 值的方法，容易引起局部 pH 值过高或过低并造成培养液渗透压的增加而不能在动物细胞培养中使用。采用二氧化碳/碳酸氢钠缓冲液系统来控制培养液的 pH 值是一种较好的方法，它主要靠预先加入培养液中适量的碳酸氢钠和通过改变气体流量中的二氧化碳含量来实现。对于在搅拌反应器中进行动物细胞大量培养可通过微机有序定量地控制加入动物细胞培养罐

内的空气、氧气、氮气和二氧化碳 4 种气体的流量，使其保持最佳的比例来控制细胞培养液中的 pH 值和溶解氧水平，使始终处于最佳状态。

在动物细胞培养中，对温度和搅拌转速的控制相对比较简单，一般采用 PID 控制，在此不作详细讨论。对溶解氧和 pH 值的控制可通过调节通入培养罐的氧气、氮气、二氧化碳和空气 4 种气体的比例来实现。但在溶解氧控制过程中，改变进入培养罐的氧气和氮气的量，也就改变了二氧化碳在气体流量中所占的比例，从而对培养液的 pH 值产生直接的影响；同样，增加二氧化碳通入量使培养液 pH 值下降，也改变了进入培养罐内气相中的氧的比例，而打乱培养系统溶氧的平衡。这样的控制，无论对 pH 值还是溶氧值都不可能得到满意的结果。因此，必须采用匹配的方法，组成具有相互补偿作用的 pH 值和溶氧关联控制系统，以减小培养系统中 pH 值和溶解氧水平的波动，达到所要求的控制精度，满足动物细胞生长的需要。关联控制单元是控制系统的核心，其框图见图 2－7[20]。

华东化工学院的 CellCul－20 系统取 3s 为一个控制周期，由 4 个电磁阀按一定规律定量而有序地在控制周期内连续操作。4 种气体通过波形如图 2－8 所示。采用 4 种气体的 pH 值和溶氧关联控制系统，pH 值设定值为 7.1，溶氧设定值分别为 30%和 50%，对微载体悬浮培养 Vero 细胞进行了考察，结果良好。

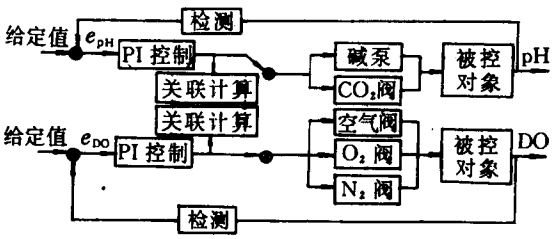


图 2－7　关联控制单元工作原理框图

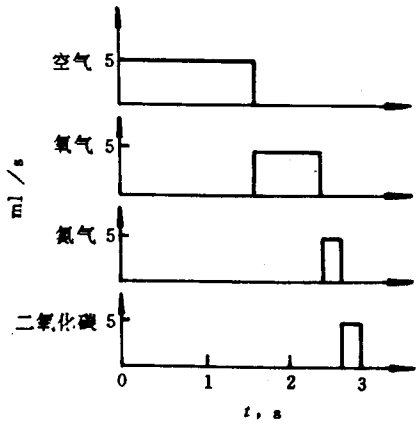


图 2－8　控制周期中 4 种气体通气波形图

参考文献

1　Van Wezel A L. Nature, 1967, 216:64

2　Flischaker R. 1987, In "Large Scale Cell Cuture Technology" (B. K. Lydersen ed). Macmillan Publishing Company, New York:p59

3　Hirtenstein M, et al. 1980, Develop. Biol. Standard. 46:109

4　Van Wezel A L. 1982, J. Chem. Technol. Biotechnol. 32:318

5　Lim F. 1984, In "Microencapsulation." CRC Press, Inc., Boca Raton, FL., p137

6　Nilsson K, et al. 1983, Nature, 302:629

7　Glacken M W, Huang C and Sinskey A J. 1989, J Biotechnology, 10:39

8　Birch J R. 1985, Biochem. Soc. Trans. 13:10

9 Prior C P, Prior G M and Hope J A. 1988, Am. Biotechnol. Lab. 6:25

10 张元兴,陈因良.1989,生物科学动态.(5):7

11 Birch J R, et al. 1987, In "Large Scale Cell Cuture Technology" (B. K. Lydersen ed). Macmillan Publishing Company, New York:p1

12 Beck C, Stiefel H and Stinnett T. 1987, Chem. Eng. (N. Y.), 94:121

13 张元兴,陈因良.1989,华东化工学院学报. 15:504

14 Hirschel M D. and Gruenberg M L. 1987, In "Large Scale Cell Cuture Technology" (B. K. Lydersen ed). Macmillan Publishing Company, New York:p113

15 Lydersen B K, et al. 1985, Bio/Technology, 2:63

16 Dean R C, et al. 1987, In "Large Scale Cell Cuture Technology" (B. K. Lydersen ed). Macmillan Publishing Company, New York:p145

17 Griffiths B and Looby D. 1991, In "Animal Cell Bioreactors" (C. S. Ho and D. I. C. Wang eds.) Butterworth—Heinemann, Stoneham, USA, p165

18 Ramasubramanyan K and Venkatasubramanian K 1990, In "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology V. 42" (A. Fiechter ed), Springer—Verlay Berlin Herdelberg, p13

19 Chisti M Y. 1989, "Airlift Bioreactors", Elsevier Science Publishers, England

20 顾小华,陈因良.1989,华东化工学院学报.15:498

第三章　细胞培养专用微载体

李雨田　陈因良　丁健椿

（华东化工学院生化工程研究所，上海，200237）

动物细胞大量培养始于60年代，当时Capstick Telling等人[1]采用悬浮培养方法成功地培养出小鼠肾细胞(BHK)。自此以后，由大量培养动物细胞生产口蹄疫苗所取得的高经济效益引起了欧洲、北美、日本等地区和国家高度重视，并投入了大量人力和巨额资金，开发动物细胞大规模培养技术，从事生产病毒疫苗、单克隆抗体、干扰素、TPA等高疗效的医药制品和诊断试剂。有人预言，21世纪将是大规模培养动物细胞生产高疗效的专用医疗产品的时代。

从国际上动物细胞培养技术的发展趋势看，主要有6个方面发展方向：(1)开发细胞培养反应器和培养系统；(2)开发培养贴壁细胞的载体；(3)开发微囊技术；(4)开发杂交、重组技术；(5)开发无血清和化学合成的培养基；(6)蛋白质浓缩和提纯技术。本文就国内外微载体开发现状及趋势作一介绍。

第一节　采用微载体培养贴壁细胞是当前最有发展前途的一种培养模式

动物细胞按其生长特性可分为悬浮生长细胞和贴壁依赖生长细胞，前者悬浮在培养基中生长，后者只能附着于固体表面生长。一些来源于血液中的细胞(如淋巴组织细胞以及大部分肿瘤细胞)都可采用悬浮培养。悬浮培养方法类似于传统微生物培养，工艺较简单，有经验可资借鉴，但悬浮培养系统有它的局限性：(1)大部分哺乳动物细胞为贴壁依赖性细胞，需要附壁培养。(2)在培养过程中细胞易变异，潜在着致癌危险，培养病毒细胞有时会失去标记，使免疫能力降低，因此悬浮培养的动物细胞或细胞制品主要用作诊断试剂，不宜直接用于人体。(3)悬浮培养的细胞密度低。

贴壁细胞的培养是一种附壁培养，它经历实验室方瓶到工业规模转瓶培养这样发展过程。滚瓶培养有其固有的缺点，首先其表面积有限，一只具有1600cm^{2}表面积的滚瓶已相当大了，而1.0 g微载体却能提供5000～6000cm^{2}的表面积，单位体积所提供的细胞生长表面积小，细胞生长密度低；其次培养时监测和控制环境条件(如pH、DO、温度)受到限制；此外劳动强度大，占用空间大。而采用微载体悬浮培养则显示出很多优越性。

所谓微载体是指直径在60～250μm、能够适用于贴壁细胞生长的微珠。1967年Van Wezel首先开发微载体培养动物细胞[2]，当时选用阴离子交换树脂Sephadex A50培养动物细胞并获得成功。其后Van Hemert、Spier及Whiteside也相继作了培养BHK21等细胞及生产

口蹄疫苗的报道[3]。自此以后微载体培养动物细胞得到迅速的发展。采用微载体培养有以下优点：(1)表面积/体积(S/V)大，如 1.0 g Cytodex 1 微载体能提供 5000～6000cm^2 表面积，以 1.0mg 微载体/ml 培养基浓度计，表面积/体积培养基达 5cm^2，足够(750～1000)×10^6 个细胞生长，若提高微载体浓度，细胞产率会更大。因此它的单位体积培养基的细胞产率高。(2)由于采用均匀悬浮培养，把悬浮培养和贴壁培养融合在一起，具有两种培养优点，简化了细胞生长各种环境因素的检测和控制，培养系统重现性好。(3)用简便的显微镜观察即能监测出细胞在微珠生长情况。(4)培养基利用率高。(5)收获细胞过程不复杂。(6)放大容易，国外已发展到 1000L 规模培养生产 β-干扰素用的人体二倍体细胞。(7)劳动强度小。(8)培养系统占有空间小。由于微载体培养细胞具有以上优点，是目前公认的最有发展前途的一种培养模式。

第二节　动物细胞在微载体上贴壁生长机理

贴壁依赖动物细胞在微载体表面上增殖，可分为贴壁、生长和扩展成单层 3 个阶段。

细胞能否在微载体表面贴附，一是取决于细胞与微载体接触的机率，二是取决于细胞与微载体的相融性，这又与基质表面的化学物理性质相关。欲提高细胞与微载体上的接触的机率，理论上可以采用增大搅拌转速从而提高两者碰撞频率来实现。但实际上，对动物细胞来说，这种办法是行不通的。因为动物细胞与霉菌、细菌、酵母细胞不同，后者有一层坚韧的外壁，能承受较大的剪切力，而前者只包含一层原生质，细胞结构脆弱，稍大一点剪切力甚至碰撞都可能招致细胞损伤。另一方面，即使在高转速下，提高了细胞与微载体接触的机率，但也相应缩短细胞贴壁所需时间导致细胞来不及贴壁即被湍流流体带走。因此，一般操作方式为在贴壁期采用低搅拌转速，时搅时停，经数小时后，俟细胞附着于微载体表面，维持设定的低转速，进入培养阶段。

细胞能否迅速贴附在微载体表面也与微载体表面的物理-化学性质有关。一般脊椎动物细胞在生理 pH 值下表面都带有分布不均匀的负电荷。按照一般的概念似乎微载体表面要带正电荷方能加快细胞的贴壁速度，但实际情况并不完全如此。因为控制细胞贴壁速度的基本因素是微载体表面的电荷密度而不是表面极性。如微载体表面带的是正电荷，则由于静电相吸作用，使细胞容易贴在微载体表面上，但如表面电荷密度过大则反而产生“毒性”效应。如微载体带的是负电荷，则由于静电相斥，使细胞难以贴壁。但如培养基中溶有或微载体表面吸附着二价阳离子作媒介，带负电荷的细胞也能贴附在带负电荷的微载体表面。最近研究结果表明血清中存在的一些糖蛋白如冷析蛋白(Cold insolable globulin)或纤维粘连蛋白(fibronectin)是微载体和细胞间架桥的蛋白质。因此在接种细胞之前，预先用含血清的培养基浸泡微载体或用这类糖蛋白涂抹微载体，可以加快细胞贴壁速度。

细胞在微载体上的生长速度还与细胞所处的环境条件有关。如所处的条件最优，细胞生长速度快；反之生长速度慢。所以，在动物细胞培养过程中，营养条件和环境条件(pH、DO、温度)都必须严格控制。培养基流加(fed－batch)系统不如灌注(perfusion)系统，而灌注系统又不如恒化器(chemostate)系统，其道理就在这里。

细胞扩展成单层的速度除与上述各种因素有关外，还与微载体表面情况有关。表面光滑的，细胞扩展成单层的速度快，如果是多孔的则扩展速度慢。

第三节　优良的微载体应具有的特性

细胞能否在微载体表面附着生长并扩展成一单层取决于细胞的特性、微载体理化性质、培养基成分及培养条件，而微载体性能的优良与否是关键的因素，它不仅影响培养细胞的形态、贴壁率、生长速率、细胞密度以及是否容易收获细胞或其分泌产物，乃至于产物的整个生产成本。

就作为微载体的基质而论，琼脂糖是一种天然多糖，一般不能支持细胞生长。如控制熔融后的冷却速率，使凝胶缓缓生成，则琼脂糖链形成双螺旋似纤维状结构，这种结构的琼脂糖能支持细胞在其表面上附着生长。电中性的葡聚糖不能支持细胞生长，而用 DEAE 或季胺基团修饰的带有适量正电荷的交联葡聚糖能支持细胞生长。聚苯乙烯由于表面的憎水性，不易被培养基润湿，细胞难以在其表面附着，若用氧化剂（如高氯酸、高锰酸钾等）进行表面处理或用紫外线照射、电晕放电进行表面处理，使其表面产生亲水的羧基，细胞就容易附着生长。

根据微载体悬浮培养的特点，概括来说，一种优良的微载体须具备以下特性：(1)微载体须不含有能毒害细胞的成分。(2)微载体须与细胞有良好的相容性，使细胞容易贴壁。(3)微载体密度应略大于培养基，一般要求在 1.03～1.05 之间，最大不宜超过 1.1，即经轻度搅拌微载体能悬浮在培养基中，停止搅拌又能较快地沉降下来。(4)微载体粒径在 40～120μm（干态）范围，经生理盐水溶胀后增大到 60～250μm，粒度分布要均匀，径差不大于 20～25μm，表面光滑以利于细胞铺展。(5)微载体须具有良好的光学透明性，便于显微镜观察细胞生长情况。(6)能在 PBS 中耐 120～125℃、20～30min 热压灭菌。(7)基质应是非刚性材料，避免在培养过程中相互碰撞而损伤细胞。(8)不吸收培养基中的营养成分，特别是血清。(9)收获细胞或细胞制品容易，不影响蛋白制品分离纯化。(10)价廉，能重复使用。

然而从国外商品化的微载体看，尚未有能全面符合上述要求的微载体，因此很多国家仍在不断地致力于开发新型的性能良好的微载体。

第四节　国外微载体研制现状及发展趋势

由于对微载体培养技术的重视，国外已开发了数量颇多的微载体，有些已商品化，这里仅按基质材料划分对它们的性能作一简介。

一、交联葡聚糖为基质的微载体

交联葡聚糖为基质的微载体是目前使用最广的一类微载体，为大家熟悉的 Cytodex 系列就是这类微载体[4]。

1. DEAE－交联葡聚糖

其结构为：交联葡聚糖－O－CH_2－CH_2－N(C_2H_5)$_2$ · HCl。它原是一种阴离子交换树脂，Van Wezel 最初直接借用交换容量为 5.5meq/g（干）的 DEAE－Sephadex A50 培养贴壁细胞，但在试验中发现，当微载体浓度超过 1mg/ml 培养基时会产生“毒性效应”，具体表现在有(50～75)%接种细胞损失，细胞生长有较长的滞后期；如浓度超过 2mg/ml 培养基时，接种细胞的损失更大，并能抑制细胞的生长。为了降低微载体毒性，曾采用多种方法，其中有用血清、硝酸纤维素或羧甲基纤维素对微载体 A50 预处理及提高细胞接种量等，但所有这些收效甚

微。直到 1977 年 Levine 等人通过控制交换容量，即降低电荷密度可降低“毒性”，并认为交换容量在 1.5～2.0meq/g(干)细胞培养性能最好(见图 3－1、图 3－2)。商品微载体 Cytodex 1 (Pharmacia Sweden)、Superbeads (Flow Labs)其交换容量即为 1.5～2.0meq/g(干)之间。Cytodex 1 是当前用途最广的一种微载体，能适应培养的细胞不下 60 种，其缺点主要是对血清有较强的吸附作用，因此开发了表面带电荷的 Cytodex 2。

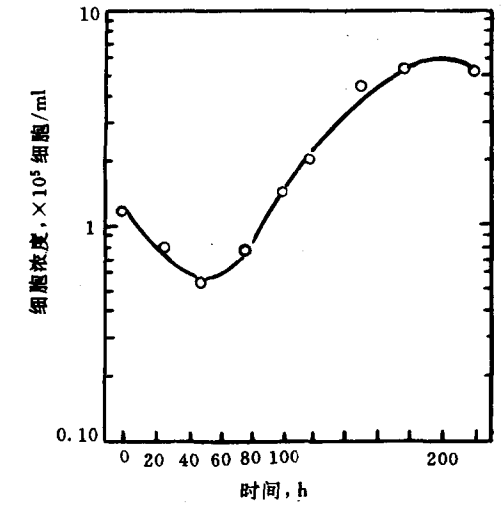


图 3－1　人二倍体成纤维细胞 HEL299 在微载体浓度 1g DEAD－Sephadex A50/L 时生长曲线

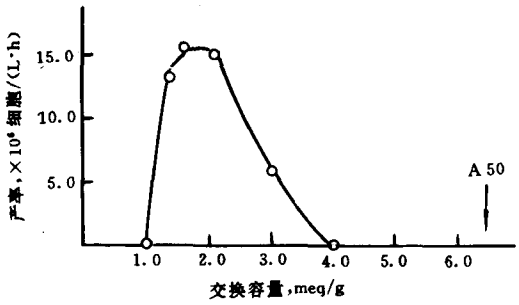


图 3－2　微载体浓度为 5g/L 时交换容量对细胞生长的影响

2. Cytodex 2 微载体

这是一种季胺结构的微载体，带正电荷的 *N*，*N*，*N* －三甲基－二羟基胺基－丙烷经氨介反应偶联在交联葡聚糖微珠表层，其结构式为：交联葡聚糖—O —CH_2 —CH(OH)—$CH_2N(CH_3)_3$。与 Cytodex 1 整个微珠带有正电荷不同的是，Cytodex 2 仅在表面带有正电荷，而且电荷密度要低得多[0.6meq/g(干)]。基本上不吸收培养基中成分及代谢产物。它特别适合于生产病毒和从原代细胞或成纤维形二倍体细胞生产细胞制品。

3. Cytodex 3 微载体

交联葡聚糖经环氧氯丙烷活化后偶联变性胶原即为 Cytodex 3 微载体，其结构为：交联葡聚糖—O —CH_2 —CH(OH)—CH_2NH —(－ε lys collagen)。由于变性胶原对多种细胞具有优良的亲和性，细胞通过纤维粘连蛋白与胶原发生配位型结合，细胞在胶原上生长形态自然，特别对上皮形态细胞的贴壁培养更有其独特的优点，其它如肝细胞、成纤维细胞、软骨细胞、表皮细胞或肌细胞等也用这种微载体进行过常规培养。经水解蛋白酶特别是胶原酶消化后，容易收

获细胞，且剥落过程中细胞不受损伤，活细胞收获量高。至今 Cytodex 3 被 认为是一种最优良的微载体。

二、纤维素为基质的微载体

DEAE -纤维素(DE－52、DE－53、Whatman)原先也是用作离子交换剂，后经 Reuveny 等研究表明[5,6,7]，这种阴离子交换剂也能用作增殖多种贴壁依赖细胞和生产生物制品。值得一提的是当细胞在 DE－52、DE－53 微载体上长满后，细胞能彼此吸附形成细胞桥。如原代细胞(CEF、鼠神经细胞、鼠肌细胞)、人腺癌细胞在这类微载体上生长成细胞-微载体聚团，细胞重叠成若干层，聚团中心细胞所需营养物质由培养基流过载体微孔(～500nm)来提供，形成高密度细胞培养。

由于纤维素原料易得，合成程序不复杂，培养的细胞范围广，是一种值得开发的微载体。

三、蛋白质为基质的微载体——变性胶原微载体[8]

变性胶原溶液分散于有机相(如甲苯、矿物油)经戊二醛交联，取后用 $NaBH_4$ 还原，即得到淡黄色的变性胶原微载体。这种微载体具有优良的表面性质和光学性质，能与多种细胞自然配位结合，细胞贴壁、生长和收获都容易，是一种优良的培养贴壁细胞的微载体。其缺点是能吸附培养基中有效营养成分，特别是血清。

四、高分子合成材料为基质的微载体

1. 聚苯乙烯微载体

聚苯乙烯用作动物细胞培养的载体已为大家所熟悉，实验室常用的塑料组织培养皿、瓶的材质大部分是聚苯乙烯，经组织处理和表面处理后能使动物细胞优化生长。Nielsen 和 Johansson[9]将单体苯乙烯经悬浮聚合后所得珠体再经适当的表面处理，开发了表面负电荷密度为$(2\sim10)\times10^{14}PC/cm^2$ 聚苯乙烯微载体，商品名为 Biosilon，并由 Nunc Demark 公司批量生产，其透明、折光率近于玻璃，在显微镜下观察能得到周边无暗影的全象，但没有象 Sephadex 那样清晰。Biosilon 微载体适应培养的细胞型相当广，其最大的优点是不摄取培养基中营养成分特别是血清，因而能制备高纯度生物制品，且经适当处理后可重复使用。但 Biosilon 也存在一些缺点：(1)与带正电荷微载体相比贴壁速度慢。(2)由于材质刚性结构，在搅拌条件下微珠与微珠间的碰撞容易损坏细胞。(3)由于微珠是无孔的，需较高的转速方能使微载体均匀悬浮在培养介质中。克服这一缺点可采用添加某些水溶性高分子量聚合物，增加介质粘度阻止微珠沉降，或在接种后 24h 内不加搅拌直至细胞贴附于微载体上后，采用特殊的低转速进行培养。改善聚苯乙烯微载体表面特性的另一办法是用戊二醛将胶原蛋白交联在微载体表面，使细胞容易贴壁生长。

2. 苯乙烯-二乙烯苯共聚微载体

文献中报道这类微载体有 3 种类型：带负电荷(经磺化处理)、带正电荷(用聚乙烯亚胺覆盖)和用胶原覆盖微载体。它们用于研究内皮细胞和 HeLa 细胞的超微结构和生化性质，优于其它一些商品微载体[10]。

3. 聚甲基丙烯酸羟乙基酯微载体

聚甲基丙烯酸羟乙基酯是一种无毒性、无抗原性、生物相容性好的高聚物，因而可用作微载体的基质。但聚甲基丙烯酸羟乙基酯不能与纤维粘连蛋白结合，故不能支持细胞贴壁和生长。为此在聚合时添加少量憎水性单体甲基丙烯酸酯和少量带电荷的单体二甲基乙胺基甲基丙烯酸酯使之共聚来改善表面性质，以有利于细胞附着生长。文献所道[11]，将该微载体用于培

养 BHK 细胞，在相同条件下与 Cytodex 1 和 Cytodex 3 进行对比，无论细胞生长速度或是倍增时间皆优于后两者微载体。

除甲基丙烯酸羟乙基酯外，其它丙烯酸酯系列的化合物如丙烯酸-2-羟基乙基酯等也可用作合成微载体基质。

4. 聚乙烯基吡啶微载体

最近日本报道[12]，将 4-乙烯基吡啶与苯乙烯、二乙烯基苯通过悬浮共聚可制得适于细胞培养的微载体，成珠后毋需化学修饰即可用于培养。该微载体的主要优点是光学透明性好，不吸收培养基，稍加处理即可重复使用。

除乙烯基吡啶外，其它乙烯基氮杂环，如 1-乙烯吡唑、5-乙烯基吡唑、4-乙烯基吡啶等与丙烯酸或丙烯酸甲酯或丙烯酰胺接枝共聚都可合成细胞贴壁性能优良的微载体。

5. 聚丙烯酰胺微载体

将丙烯酰胺和交联剂甲叉双丙烯酰胺用反相悬浮聚合，再经伯胺或叔胺基团修饰，可制备珠状能用于贴壁细胞培养的微载体。Reuveny[13]等人研究了伯胺及叔胺衍生微载体的细胞培养，指出交换容量在 0.3～0.9meq/g 干珠的伯胺衍生物微载体具有细胞贴壁和扩展速度快、上皮形态细胞产率高、血清吸附量低等优点。此外由于它是亲水性聚合物，其光学性质是其它塑料基质无法比拟的，在显微镜下观察，透明度与交联葡聚糖接近。

6. 硅橡胶微载体

将未硫化的硅橡胶液分散在硅橡胶凝固剂中成珠，然后经紫外线照射使之交联，成为硅橡胶微载体。该微载体用于培养 DETRICT 551 二倍体细胞，经 5 天培养细胞增殖比达 4～5。

五、无机材料玻璃为基质的微载体[14]

1. 中空玻璃微载体

玻璃是贴壁培养动物细胞的优良基质，用玻璃基质加工成大量培养动物细胞的载体，一般都是球状，球径大小随培养模式不同而异。如是固定床培养，玻璃珠直径可达 3mm，培养的细胞一般作为大量培养的种细胞。如是悬浮培养，微载体粒径为 100～150μm。由于玻璃微珠的密度大，轻度搅拌难以均匀地悬浮在培养基中，一般可采用下列方法来降低微珠密度：

(1) 通过特殊加工制成相对密度为 1.04 左右的中空微珠；

(2) 用腐蚀液侵蚀，加工成相对密度 1.03～1.09 的多微孔微珠；

(3) 用聚苯撑氧作母体，沉渍一层玻璃，得到相对密度在 1.03～1.2 的微珠。

2. 明胶涂覆的多孔微载体

多孔玻璃微珠用明胶涂覆再用戊二醛交联，或采用偶联剂 γ-氨基丙基三乙氧基硅烷，将明胶偶联在玻璃微珠表层，所得微载体性能更好。用它培养 RFC 细胞，接种 3h 后，几乎所有细胞都贴附在载体表面，细胞增殖速率比通用单层培养高 9.8 倍。

玻璃基质微载体的优点：

(1) 一切细胞系，包括人二倍体成纤维细胞在内，都能在玻璃上生长并能重现。

(2) 用胰蛋白酶消化细胞/微载体，容易把细胞从载体上剥脱下来。

(3) 在搅拌情况下稳定性高。

(4) 玻璃不吸附培养基中血清，用后的微载体稍加处理即可重复使用。

(5) 价廉。

六、液膜微载体

固体基质微载体培养动物细胞还存在着两个缺点：(1)在培养过程中，大多数通用的微载体基质能牢固的吸附培养基中的血清，致使微载体变性，很难处理使其恢复，故只能一次性使用，因而产品的成本高。(2)需要胰蛋白酶消化细胞/微载体，将细胞从微载体上剥落下来。进行这一过程往往有大量的细胞损失掉，有时能高达 20%。为了能克服上述两缺点，Charies 等人[15]研制开发了液膜微载体新工艺。60 年代 Rostnberg 曾提出动物细胞能贴附在氟碳化合物液体表面生长和扩展，根据这一结论，Charies 等人将氟碳化合物液体与接种细胞培养基在乳化状态下搅拌混合，氟碳化合物即分散形成 100～500μm 微液珠，动物细胞即贴附于微液珠表面生长和扩展。当停止搅拌时，将混合物离心分相，培养的细胞游离地悬浮在轻相(有机相)和重相(培养基相)之间，有明晰的界面，用移液管即可方便地移出。这一工艺革除了胰蛋白酶消化程序，氟碳化合物经洗涤处理后又可重复使用。Charies 等人曾用以培养 BALB－3T3、SV－T2、鼠细胞及人神经包皮纤维形细胞，都得到比较圆满的结果。

以上介绍的微载体，有些尚在实验室研究中，有些则已成为商品。表 3－1 中列举了主要的可供使用的微载体及其特性。从近期微载体发展情况看，高分子材料为基质的微载体大有潜力，由于具有原材料丰富、价格便宜、不吸收培养基、可重复使用等特点，得到人们重视。此外开发适用于高密度细胞培养的微载体也是当前合成微载体的研究方向。如瑞典 Percell 公司新推出的商品名为 Cultispher－G 大孔微载体就是一例，设计这一微载体的构思是把提高细胞生长表面与保护细胞免受剪切力损伤以及提高气液接触面结合起来，制备内部含有大孔结构的多孔性微载体(Macroporous Microcarrier)。这种结构的微载体除具有通常微载体优点以外，还具有以下特点：(1)由于微载体内部存在很多大孔结构，给细胞提供了更多的生长表面，而一般微载体一旦细胞扩展覆盖满球表面后，细胞就停止增殖，因此细胞生长密度高。培养结果显示，BHK 21 细胞 8 天后细胞密度可达 3×10^9 个细胞/g 干 MC。CHO 细胞培养 13 天后可达 3.5×10^9 个细胞/g 干 MC。(2)细胞贴附于腔内壁增殖，避免受剪切应力的影响，即使在较高的转速下也不损伤细胞。(3)由于提高了气液接触面，细胞能得到更为丰富的营养，细胞生长环境更好，培养的细胞寿命长，特别有利于分泌型细胞。唯一令人遗憾的是，由于内部多孔结构产生折射现象，致使其光学透明性差，显微镜下观察细胞形态比较模糊。图 3－3、图 3－4 是 CHO、重组 CHO 及 BHK－21 细胞在大孔微载体上生长曲线及细胞形态。

第五节　研制开发国产微载体的必要性

我国微载体系统大规模动物细胞培养起步较晚。微载体市场又为国外商品所垄断，因此研制开发国产微载体并实现系列化，首先将促进我国动物细胞培养技术的发展，进而推动整个大规模动物细胞培养工业和现代生物制品产业的发展，满足国内对病毒疫苗等高疗效药物和诊断试剂的迫切需要。其次从经济效益看，微载体是一种价格昂贵的细胞培养专用介质，其销售价仍呈上涨趋势。兹以 Pharmacia 公司 Cytodex 系列微载体为例，5 年来其价格变化如表 3－2 所示。从表中可见，Cytodex 3 1988 年为 48 美元/10g，而 1992 年已达 69 美元/10g，上涨幅度近 44%。大部分微载体只能使用一次，而国产微载体价格则大大低于同类进口产品，所以实现微载体国产化，必将为国家节省大量外汇，降低产品生产成本，具有十分明显的社会效益和经济效益。

表 3－1　可使用的商品微载体

微载体类型	商品名	制造厂	微载体基质	带电荷基团	交换能力	形状	大小 μm	表面积 cm^2/g	孔率	透明性	建议的灭菌程序
叔胺基微载体	Biocarrier	Bio－Rad USA	聚丙烯酰胺	Dimethyl－aminopropyl	1.4meq/g 干料	珠状	球径 120～180	5000	＋	＋	HEPES－NaCl 缓冲液热灭菌(pH＝6.4)
	Cytodex 1	Pharmacia Sweden	葡聚糖	Diethylamino ethyl(DEAE)	1.5meq/g 干料	珠状	球径 131～220	6000	＋	＋	磷酸缓冲液热灭菌(pH＝7.2)
	Superbeads	Flow Labs USA	葡聚糖	Tri－ethyl－2－hydroxyl aminopropyl	2.0meq/g 干料	珠状	球径 135～205	5000～6000	＋	＋	磷酸缓冲液热灭菌提供灭菌的微载体
	CT－1	华东化工学院	葡聚糖	DEAE	1.5meq/g 干料	珠状	球径 120～200	5000	＋	＋	磷酸缓冲液热灭菌(pH＝7.2)
表面带电荷微载体	Cytodex 2	Pharmacia Sweden	葡聚糖	Tri－ethyl－2－hydroxyl aminopropyl	0.6meq/g 干料	珠状	球径 114～198	5500	＋	＋	磷酸缓冲液热灭菌(pH＝7.2)
胶原及胶原涂层微载体	Cytodex 3	Pharmacia Sweden	葡聚糖	胶原	60μg 胶原/cm^2 表面	珠状	球径 133～215	4600	＋	＋	磷酸缓冲液热灭菌(pH＝7.2)
	CT－3	华东化工学院	葡聚糖	胶原	10mg 胶原/g 干料	珠状	球径 120～200	4600	＋	＋	磷酸缓冲液热灭菌(pH＝7.2)
	CT－2	华东化工学院	胶原	胶原	100%胶原	珠状	球径 120～200	3000～4000	＋	＋	磷酸缓冲液热灭菌(pH＝7.2)
组织培养处理的聚苯乙烯	Biosilon	Nunc Demark	聚苯乙烯	负电荷(组织处理)	表面电荷 $(2\sim10)\times10^{14}$ 电荷/cm^2	珠状	球径 120～300	225	－	±	提供灭菌的微载体干料(γ射线照射后)
	Cytosphere	Lux USA	聚苯乙烯	负电荷(组织处理)	表面电荷 $(2\sim10)\times10^{14}$ 电荷/cm^2	珠状	球径 160～230	225	－	±	提供灭菌的微载体干料(γ射线照射后)
DEAE 微孔纤维	DE－52	Whatman England	微孔纤维	DEAE	1meq/s 干料	圆柱形	径 40～50 长 80～400	N.D.	＋	－	磷酸缓冲液热灭菌(pH＝7.2)
	DE－53	Whatman England	微孔纤维	DEAE	2meq/s 干料	圆柱形	径 40～50 长 80～400	N.D.	＋	－	磷酸缓冲液热灭菌(pH＝7.2)

表 3－2　Phaimacia 公司生产的 Cytodex 系列商品价格

微　载　体	重　量,g	价格,美元	
		1988 年	1992 年
Cytodex 1	25	102	132
	100	348	444.75
Cytodex 2	25	117	126
	100	399	441.05
Cytodex 3	10	48	69
	100	382	455.55

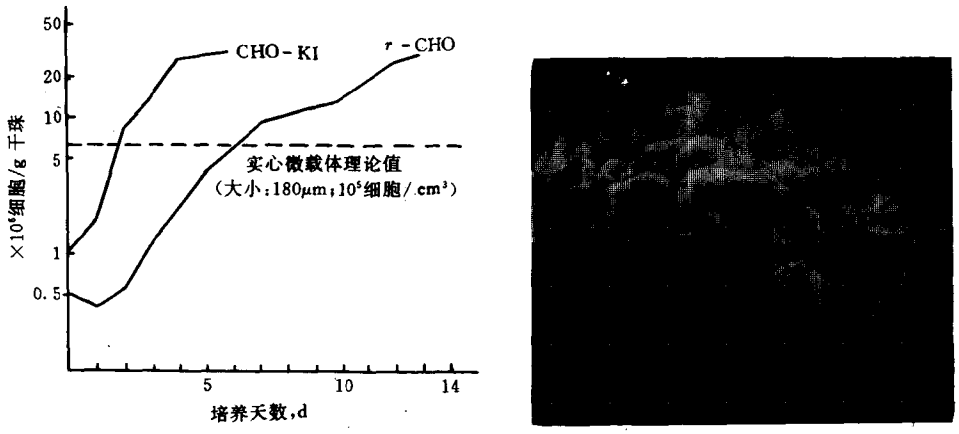


图 3－3　CHO 及重组 CHO 细胞在大孔微载体上的生长情况

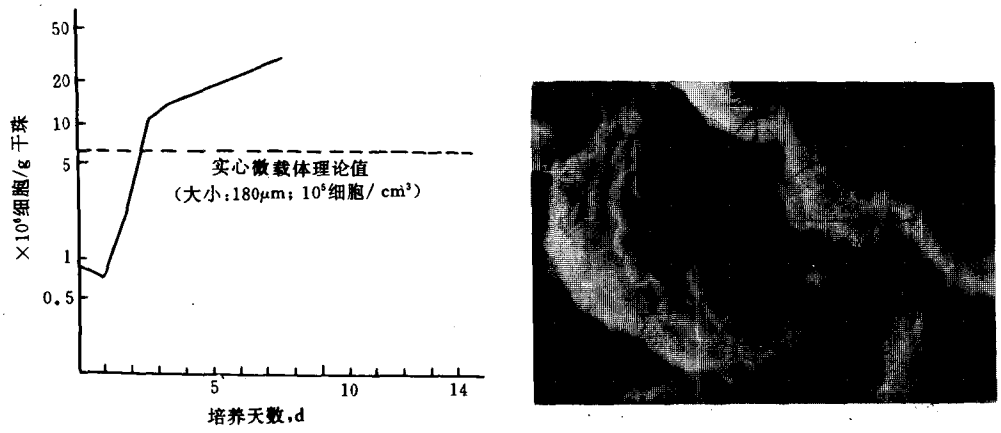


图 3－4　BHK－21 细胞在大孔微载体上的生长情况

华东化工学院生化工程研究所于 1987 年开始了合成国产微载体研究。图 3－5～图 3－7 为 Vero 及鱼类细胞 ZC－7901、CP－80 在 GT－2 微载体上的培养曲线，图 3－8、图 3－9 为 Vero 及草鱼细胞在 GT－2 微载体上生长形态的电镜照片。

可以预见，随着微载体系列的研究开发以及中试基地的建立，国产微载体系列产品将出现在国内市场上。

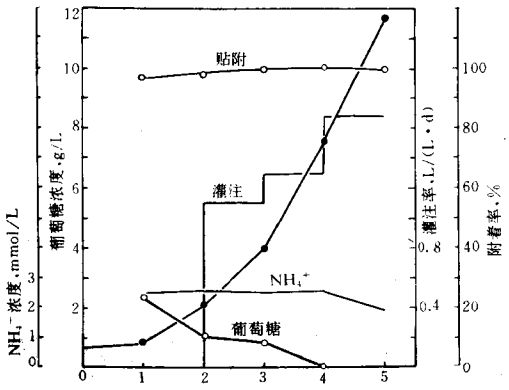


图 3－5　Vero 细胞培养曲线

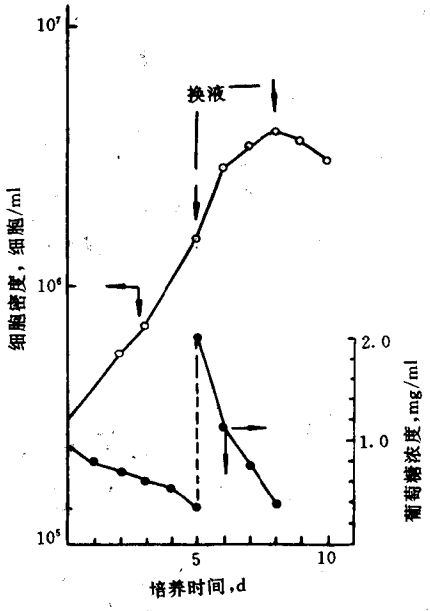


图 3－6　ZC－7901 细胞在 GT－2 上生长代谢情况
（箭头表示换液）

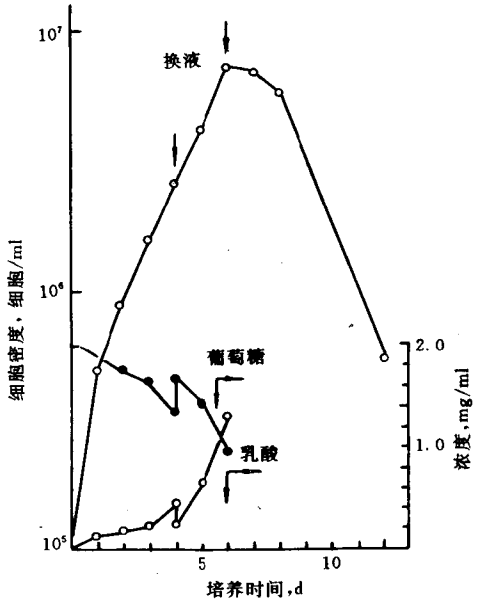


图 3－7　CP－80 细胞在 GT－2 上生长代谢情况

图 3－8　Vero 细胞在 GT－2 上生长形态

图 3－9　草鱼细胞 CP－80 在 GT－2 上生长形态

参考文献

1 Capsitick P B, et al. Nature, 1962, 195: 1163

2 Van Wezel A L, Nature, 1967, 216:64

3 David W, et al. Biotech. Bioeng. 1979, 21:821

4 Pharmacia Fine Chemicals: Microcarrier Cell Culture:Principle and Methods, 1982

5 Reuveny S, et al. In Vitro, 1982, 18:92

6 Reuveny S, et al. Dev. Biol. Stand. 1980, 46:137

7 Reuveny S and Siberstein L. Dev. Biol. Stand. 1982, 50:115

8 Nielson K and Mosbach K. FEBS Lett. 1980, 118:145

9 Johansson A and Neilsen V. Dev. Biol. Stand. 1980, 46:125

10 Jacobson B S and Ryan U S. Tissue Cell, 1982, 14:69

11 Kiremitci M, et al. Biotech. Appl. Biochem. 1991, 14:170

12 J01055175

13 Reuveny S. Biotech. Bioeng. 1983, 25:469

14 Wass J A. In Vitro, 1982, 18:311

15 Charles R, et al. Science, 1980, 219:1448

第四章　动物细胞的微囊化培养

吉鑫松　陈国荣　朱冬发　袁中一

（中国科学院上海生物化学研究所，上海，200031）

随着生物工程的发展，使得很多原先只由动物体产生的蛋白质可由重组微生物生产，如重组大肠杆菌表达和生产人胰岛素和人生长激素。然而，由于微生物细胞缺少蛋白质的转录后修饰机制，由重组微生物产生的不少蛋白质分子不具有所期望的生物学功能或活力。但是，动物细胞却具备微生物所缺乏的蛋白质转录后的修饰功能，而且动物细胞的产物往往分泌于细胞外，这将给随之而来的下游工艺带来方便，为此利用动物细胞生产有价值的生化药物的技术越来越被人们所重视。为了适应市场对这些药物的日益增加的需要，人们将大量的人力、物力投向了哺乳动物细胞的大规模培养技术的研究和开发。

通常，动物细胞培养大致采用悬浮培养及滚瓶系统的贴壁培养方法。由于动物细胞本身的特性及培养方法的限制，动物细胞的大规模培养还存在不少的困难：动物细胞生长速率慢，产物的生产率也低，从而造成产物浓度也低；动物细胞培养基成份复杂，价格昂贵；动物细胞没有植物细胞和微生物细胞那样的细胞壁，易受机械搅拌所引起的剪切力的影响；此外，常规的细胞培养方法也不太适用于大规模培养。上述这些限制造成了大规模动物细胞培养所需费用高，技术难度大，规模越大、影响也越大。

动物细胞的大规模的培养确有不小的困难，但它的优点也是明显的、诱人的，关键是如何提高细胞在反应器内的密度，提高细胞的稳定性以及生产率。动物细胞的固定化及其培养是解决问题的有效途径，在这一章里我们则着重介绍其中的一种方法，即动物细胞的微囊化培养。

第一节　动物细胞的微囊化

一、微囊化概述

微囊化是固定化技术中的一种，它是用一层亲水性的半透膜将酶、辅酶、蛋白质等生物大分子或动植物细胞包围在珠状的微囊里，从而使得酶等生物大分子和细胞不能从微囊里逸出，而小分子的物质、培养基的营养物质可自由出入半透膜，达到催化或培养的目的。图 4－1 给出了微囊化细胞的模式图。

据此，T. M. S. Chang 在 60 年代后期首先提出了人工细胞的概念。他将酶、辅酶、激素、蛋白质、离子交换剂和活性炭包在微囊里，从而达到反复催化化学反应的目的。然而，他及后来的一些研究者的微囊化方法不适宜动物细胞。70 年代末至 80 年代初，Lim 和 Sum[1]应用海藻酸——聚氨基酸制备微囊化细胞获得了成功，细胞在微囊里能够成活，亦能培养生长。动物细胞

微囊化后，与游离细胞比较，降低了培养时对细胞的剪切力，微囊里实际上是一种微小的培养环境，与液体培养差不多，因而能使细胞生长良好。在培养过程中，微囊化也能提供很高的细胞密度，使得产物浓度增加，纯度提高。动物细胞微囊化的成功，克服了大规模细胞培养的一些缺点，具有广泛应用的前景，使得动物细胞微囊化的研究非常活跃地发展起来。

二、动物细胞微囊化方法

自本世纪60年代固定化酶技术问世以来，用微囊化方法包埋生物大分子及细胞的方法很多[2]，但并不是所有的方法都能适合于动物细胞的，它必须具备以下一些条件：微囊化的过程要温和，快速，不损伤细胞，尽可能在液体状态和生理条件下制备；微囊化所用的试剂和膜材料必须对细胞无毒害作用；微囊化所形成的膜必须能使营养物和代谢产物自由通过，膜的孔径可以控制；膜应具有足够的机械强度以抵抗培养过程中的搅拌，不至使微囊破裂。总观目前的方法用得最多的是聚赖氨酸/海藻酸(PLL/ALG)法。

1. 聚赖氨酸/海藻酸(PLL/ALG)微囊化

(1) 原理　海藻酸是以1,4键连接的聚醛酸，其主要成份是甘露糖醛酸和古罗糖醛酸。当它的水溶液以钙盐的形式存在时，则成凝胶状态；而用螯合剂将钙离子去除后，则海藻酸又回复到溶液状态；当海藻酸钙凝胶用聚赖氨酸处理后，其接触部分不再被螯合剂去钙而溶解。据此，人们就可以先将动物细胞与海藻酸溶液混合，经过微囊发生器滴入 $CaCl_2$ 溶液中形成凝胶微珠，然后用聚赖氨酸溶液处理微球表面，最后再用柠檬酸去除微珠的钙离子，这样，微珠内的海藻酸成液态，动物细胞悬浮其中，而微珠表面由于受到聚赖氨酸的处理而不再溶解，形成一层薄膜，动物细胞就被这层膜包在微囊里了，如此就可制成细胞微囊。

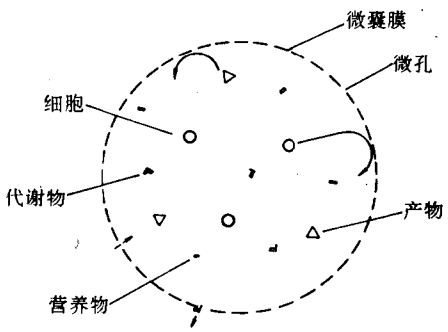


图4－1　微囊化细胞的模式图

(2) 微囊化装置及步骤　在制备微囊化细胞过程中，得到一定大小、非常均一的微囊是非常重要的。要做到这一点需要微囊发生器来完成，其基本构造如图4－2所示。它由针头、细胞海藻酸混合溶液储放池、压缩空气套筒3部分组成。操作时，细胞海藻酸溶液由针头流出时受到套筒中的压缩空气的吹打作用而成微滴，当其喷射入 $CaCl_2$ 溶液中后就形成凝胶珠，其直径的大小由针头及压缩空气的大小而决定。

通常，制备微囊化动物细胞要经过以下几步：

① 无菌收集动物细胞，离心后用生理盐水洗涤；

② 再离心收集细胞，并加入海藻酸钠溶液混合均匀，使成悬浮液；

③ 将悬浮液装入微囊发生器中制成微滴；

④ 微滴加到 $CaCl_2$ 溶液中形成凝胶珠；

⑤ 凝胶珠用生理盐水洗去残留的 $CaCl_2$；

⑥ 凝胶珠悬浮于聚赖氨酸溶液中，使之形成膜；

⑦ 凝胶珠再用 $CaCl_2$ 溶液洗，用 CHES 缓冲液固化；

⑧ 凝胶珠用生理盐水洗涤后，再用 ALG 溶液处理；

⑨ 生理盐水洗涤后的凝胶珠加 0.05 mol/L 柠檬酸溶液处理，使半透膜内的 ALG 成液态，然后再用生理盐水洗。

如此得到的动物细胞微囊就可以悬浮于培养基中培养了。

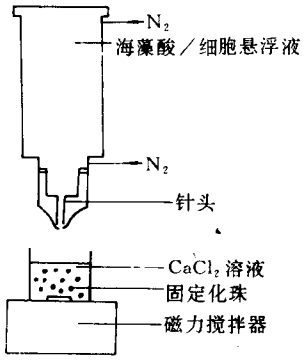


图 4－2　微囊发生器示意图

(3)　影响微囊化的一些因素　微囊半透膜的孔径是培养基营养成分、代谢物进行膜内外交换、截留一定分子量蛋白在囊内的关键，如何选择是一重要问题。微囊的膜是多阴离子的海藻酸与多阳离子的聚赖氨酸相互作用而形成的。研究表明，此半透膜的孔径主要由聚赖氨酸的分子量决定，一般来说用高分子量的聚赖氨酸(PLL)复膜孔径大，PLL 分子量低、孔径小[3]，通常使用 40000～80000 分子量的 PLL。研究还表明，PLL 溶液的浓度及处理时间、溶液的 pH 值及使用温度也都会影响膜的孔径。

海藻酸的纯度、粘度及甘露糖醛酸和古罗糖醛酸的比例都会影响微囊的形成及机械性能。纯度高、粘度高容易成囊；含古罗糖醛酸多的海藻酸容易成囊，机械性能好，不易破碎[4]。因此在使用海藻酸时必须慎重地选择。

此外，在进行微囊化时要注意到保持动物细胞的存活率，这与微囊化时间的长短、温度、溶液的 pH 值、保持溶液等渗等都有着密切的关系，需特别注意。微囊化时动物细胞在海藻酸溶液中的初始浓度也与存活率有关，不同的细胞，所用浓度不同，一般在 10^4～10^6 个/ml。

有的研究者简化了微囊化的步骤，省去了用柠檬酸液化，但在培养时必须采用 PRMI 1640 培养基，它含有较高的磷酸盐浓度，在培养过程中足以溶解囊内的海藻酸钙凝胶，使细胞在囊内悬浮培养[5]。

2. 其它的微囊化方法

在细胞微囊化技术中，目前主要采取 PLL/ALG 的方法，但也在进行新的方法的探索。不外两方面，一是 PLL/ALG 的改进，一是全新的方法，不管是哪一种都在研究阶段，还很不成熟。

(1)　海藻酸钙微囊[6]　这是一种以甲基纤维素代替 PLL 的方法，是由 Vorlop 等提出的。他将动物细胞与 1.1%甲基纤维素的 $CaCl_2$ 溶液($CaCl_2$ 浓度为 1.3%)以 1∶3 的比例混合，然后将混合液滴入 0.75%的海藻酸钠溶液中，反应 15min 后在液滴四周就形成了一层海

藻酸钙的膜，包围动物细胞在囊内，一般微囊直径达 2.5mm。此方法简单，但强度不够，容易破碎。

（2） 脱乙酰几丁质/海藻酸钠微囊[7] Pha 等研究将脱乙酰几丁质引入到动物细胞微囊化中。他们用 0.1%(w/v)的脱乙酰几丁质(pH6.5)代替 PLL/ALG 法中的 PLL，在脱乙酰几丁质与海藻酸钠反应 20min 后再用 0.05mol/L 柠檬酸钠处理，使微囊内重新液化。膜的孔径受脱乙酰几丁质溶液的离子强度的影响，此法同样也存在强度不够的问题。

（3） PLL/脱乙酰几丁质/海藻酸钠双层膜微囊 包有细胞的海藻酸钠凝胶珠与脱乙酰几丁质溶液反应成膜后，用生理盐水洗涤再加入到 0.03%(w/v)海藻酸钠中反应 4min，再经生理盐水洗涤，与 0.05%(w/v)的 PLL(分子量 22000)反应 6min 以稳定膜，同样可以形成微膜。

（4） 脱乙酰几丁质/羧甲基纤维素(CMC)微囊 这是一种利用脱乙酰几丁质与 CMC 的静电作用形成半透膜使细胞微囊化的方法。将含有细胞的羧甲基纤维素钠盐(CMC)溶液经微囊发生器喷射入脱乙酰几丁质溶液中，反应 2～5min，然后倒入磷酸缓冲液中以减少几丁质的粘度，用离心的方法收集微囊、培养。

（5） 甲基丙烯酸乙基酯/甲基丙烯酸甲酯(HEMA/MMA)共聚物微囊[8] 1983 年，Lambert 等人首先提出了用 HEMA/MMA 微囊化人血红细胞的方法，随后经 Dauglas 等人的进一步研究，使方法得到完善而用于动物细胞的微囊化。其具体做法是，HEMA－MMA、PEG600 和细胞溶液按 6.7∶60∶33.3 的体积比混匀后，经过空气套筒的针头喷入碳酸二乙酯中，形成悬浮液与生理盐水混合，温和搅拌，使微囊完全形成并沉淀。

第二节 微囊化细胞的培养

微囊化细胞的培养虽然有其特殊的地方，但所用的培养基、培养工艺、反应器等与动物细胞的培养差不多，这方面的内容在其它章节已有详细的论述，本节不再重复，而只阐述与微囊化有关的及与其它固定化动物细胞培养不同的部分。

一、微囊化培养的细胞种类

根据动物细胞生长时对固体表面的依赖情况，人们通常将这些细胞分成悬浮细胞及贴壁细胞两大类。悬浮细胞生长时不需要任何固体表面的支撑，只要悬浮在培养基中就可很好地生长，大多数产生单克隆抗体的杂交瘤细胞即属此类。贴壁细胞需要依附固体表面(如培养瓶底、瓶壁、微载体等)才能很好地生长，形成单层细胞，中国仓鼠卵巢(CHO)和成纤维细胞就是典型的例子。

在微囊内，很多动物细胞，不管是悬浮细胞还是贴壁细胞都能良好地生长。据报导，仅杂交瘤细胞就有 100 多种已被微囊化培养[9]，表 4－1 列举了一些已成功培养的部分微囊化细胞。其中重组小鼠黑色素瘤细胞的最大细胞密度达到 5×10^8 个/ml 微囊。此外，胰岛细胞、肝细胞、重组细胞都成功地微囊化了。

袁中一等[10]人的工作报道了一些有趣的实验，重组成纤维细胞 HBS－1 在贴壁生长时细胞呈棱形单层生长，而微囊化后形态发生了很大的变化，由棱形变成了球形，并且呈三向实体生长，逐渐成团，与动物体内的组织形态很相似，这可能反映了微囊的微环境比较接近动物体内的环境。

表 4－1　微囊化培养的细胞种类

细胞种类	培养周期，天	最大细胞密度，个/ml 微囊	培养基
大鼠胰岛	27	NS①	CMRL1969
肝细胞	14	NS	NS
大鼠杂交瘤　187.1	27	1.5×10^7	DMEM＋5%FBS
大鼠杂交瘤　M1/9	27	1.3×10^7	DMEM＋5%FBS
鼠红白血癌 754	8	1.6×10^8	RPMI＋10%FBS
Namalwa	7	4.6×10^6	RPMI1640＋10%FBS
FS－4	NS	NS	DMEM＋10%FBS
鼠杂交瘤	24	2×10^8	EMA＋10%FBS
各种鼠杂交瘤	20～30	1.45×10^6～3×10^8	EMA＋10%FBS
鼠杂交瘤	18	5.4×10^7	DMEM
AcV1－II20			
CRL1606			
鼠杂交瘤 ATCC	NS	2.8×10^7	NS
HB8852			
鼠杂交瘤 126/38	7	NS	HGDM DIF
人肿瘤细胞	12～20	0.8×10^5～1.2×10^5	RPMI1640
鼠黑色素瘤细胞	150	5×10^8	EMA
J558I(重组)			
昆虫细胞	NS	2.5×10^7	NS
小鼠成纤维细胞(重组)	60	1×10^8	DMEM＋10%FBS
HBS－I			

①NS＝未说明。

二、培养条件

微囊化动物细胞的培养，在实验室规模可以用转瓶和 t－方瓶，要换培养液时，让微囊沉下去后倾去用过的培养液，注入新鲜培养液即可；对于大规模培养则可用摇瓶和生物反应器，一般采用的生物反应器为气升式反应器和搅拌槽式反应器。可采用分批式、灌注式、连续式等工艺培养。微囊化细胞培养时可采取各种培养基，如 DMEM、RPMI 和 EMA（加血清或不加血清）等。用新鲜培养基连续培养时，每毫升微囊的细胞密度最大可达到 1×10^8 个。

微囊化细胞培养中，微囊的大小对细胞的生长和产物的分泌有直接的影响。微囊小，物质的传递迅速，营养物和氧气可以很快地进入微囊内，以供细胞生长所需要，同时代谢产物也能及时地排放到微囊外面。这种膜内外物质的迅速交换，既可使细胞得到足够的营养，又能减少不利因子对细胞的作用，因此，小的微囊内动物细胞生长快，细胞密度高，产物分泌多。微囊大，细胞生长慢且分泌产物少。当 PLL/ALG 微囊的直径超过 500μm 时，细胞的增殖便受到明显的抑制。从另一方面看，微囊大，容易制备；微囊小，制备困难。综合考虑这两者，微囊的直径控制在 200～400μm 较为适宜。

在微囊细胞的培养过程中，微囊的体积与工作总体积之比也是一个重要因素，通常在 1：10～1：2 的范围内。它们间的比值大则生产等量产品可减小生物反应器的体积，对大规模生产是非常有利的。

微囊化以后，动物细胞被微囊膜所保护，培养时，搅拌和直接通气不致伤害细胞。为了加速细胞的生长，一般来说可以加大搅拌速度和通气量，但要注意不破坏微囊。大多数细胞经微囊

化培养后其最大细胞密度均比常规培养大，微囊化 HBS－1 细胞培养就是一个典型例子[11]。重组成纤维细胞 HBS－1 在培养瓶中静止培养是贴壁单层生长的；在微囊化后，当天可观察到细胞分散在整个微囊里；在生物反应器中培养至 4 天囊内细胞形成细胞团；到第 8 天微囊近膜处长满细胞，并开始向微囊深处发展；至 15 天时细胞密度可达 1×10^8/ml 微囊；培养至 25 天囊内充满细胞。

第三节　微囊化动物细胞的应用

目前，微囊化细胞可以在两方面应用，一是培养微囊化动物细胞以生产一些药物；二是作为药物直接用于治疗或作为筛选药物之用。

一、生产药物上的应用

1. 单克隆抗体的生产

微囊化哺乳动物细胞的主要应用是单克隆抗体的生产。微囊工艺已生产以克计的单克隆抗体[9,10,12]。微囊膜的孔径可以控制在能截留 10 万以上分子量的蛋白质的水平上，能截留单克隆抗体在微囊中。培养结束时收集微囊，破囊后从中提纯抗体。实验证明，采用批式和连续灌注式培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体，在 7～27 天微囊内的抗体浓度可达 1250～5300mg/L[9]。表 4－2 将微囊培养和悬浮培养系统进行了比较。从表中可以看出微囊系统更有利于单克隆抗体的生产，而且单克隆抗体截留在微囊中，培养获得的产物浓度和纯度均更高。抗体的纯度可达 45%～80%，培养基中血清尤其是那些 γ－蛋白能被半透膜排阻在微囊外，使纯化更简单[9]。

表 4－2　微囊培养和悬浮培养系统的比较

培养方法	抗体 mg/L	培养天数	生产 1g 抗体所需的发酵体积	生产 1g 抗体所需的培养基体积
微囊培养	2135	29	2.29	22.4
悬浮培养	131	8	9.35	9.5

2. 高值生化药物的生产

我们将微囊化重组成纤维细胞 BSH－1 分别进行了培养瓶和 Celligen 生物反应器内培养，细胞密度可达 1×10^8～2×10^8 个/ml 微囊。静止培养时，微囊化细胞可持续生长和生产 HBsAg 64 天以上。HBsAg 的 β－颗粒被截留而富集于半透膜内，总生产率为培养瓶生产的 5 倍以上。产物在电泳上显示纯度明显高。在 Celligen 反应器中微囊细胞培养 32 天，总产率可比静止培养提高 3 倍[10]。

高表达有工业价值的蛋白质的重组细胞近年更多地用微囊化培养。一种在黑色素瘤细胞中表达的分子量为 65000 的重组蛋白，已在灌注式培养系统中持续生产 150 天以上，表达产物通过半透膜扩散进入 周围的培养液，而且在蛋白生产期采用了廉价无血清培养基，使纯化更简便[13]。

3. 干扰素的生产

Jarvis 和 Grdina 通过试剂和病毒方法诱导微囊化 FS－1 和 Namalwa 细胞生产干扰素，

这两种细胞在微囊中生长比悬浮培养或单层培养更旺盛，两细胞在微囊中生产的干扰素与悬浮培养和单层培养的总产率相同[14]。

二、在治疗及药物筛选上的应用

1. 人工器官

微囊化动物细胞在排除免疫反应上可能有普遍的意义。人们已将某些器官的细胞微囊化并植入体内以期望能代替这些器官的功能，人工胰是研究得最多的一种。微囊化大鼠兰氏胰岛细胞注入大鼠腹腔内，可用于治疗糖尿病。当 4×10～4.5×10 个细胞/ml 微囊注入体内后，当天即使血糖由 400～500mg/dL 减至 100mg/dL 左右，并能长期维持正常血糖水平，在 360 天内不出现糖尿病症状[15]。这是动物细胞微囊在治疗上(实验动物)得到成功的第一个例子。除人工胰的研究外，微囊化肝细胞也被用来研究人工肝。

2. 抗癌药物的筛选

微囊化的肿瘤细胞用于估价抗癌药物对活体的作用。人的肿瘤细胞经微囊化后注入小鼠腹腔中，服用受检的抗癌药，检测微囊化的肿瘤细胞对药物的反应，结果发现抗癌药能穿透微囊的膜作用于微囊中的肿瘤细胞，抑制和杀灭的水平与其它体外和体内测定的药效一致[16]。

参 考 文 献

1 Lim F. U S 4352883, 1982

2 袁中一等．固相酶和亲和层析，科学出版社

3 袁中一等．生物工程学报．1990, 6(1): 81～84

4 宁国柏等．生物工程学报．1992, 8(2): 164～168

5 Lee C M. Biotechnology techniques, 1990, 4(5): 341～344

6 Vorlop K D. Cell Culture Engineering, Palm Coast, Florida, 1988

7 Joseph E T, in "Large－Scale Mammalian Cell Culture Technology", A. S. Lubininecki(ed) Marecl Bekker, N. Y: 1990, 343～361

8 Douglas J A, et al. Biotech & Bioeng, 1990, 36:653～654

9 Posillico E G. Biotechnology, 1986, 4:114～117

10 陈国荣．中国科学院上海生物化学研究所硕士论文集 (1992.4)

11 Yuan Z Y. Enzyme Engineering X, H. Okada, A. Tanaka & W. Blanch(eds); Annl. N. Y. Acad. Sci. 1990,6,3

12 Duff R G. Trends Biotechnol., 1985, 3:167

13 Rayner J, et al. Damon Biotech, Pers, Commun., 1988

14 Jarvis A P, et al. Biotechniques, 1983, 1:22

15 Lim F and Sun A M. Science, 1980, 210:908

16 Gorelic E, et al. Cancer Res., 1987, 47:5739

第二篇　目标产品的分离与纯化

第五章　细胞破碎和固液分离

苏志国　张华民　修志龙　姜　炜

（大连理工大学化工学院，大连，116012）

第一节　概　述

目标产物的分离纯化在现代生物技术工业中占有十分重要的位置，它决定着产品的纯度和安全性，也决定着产品的收率和成本。

不同的目标产物，由于其自身的特性和对其纯度的要求不同，所采用的分离纯化路线常常不同；但一般说来，都包括两个基本阶段：(1)产物的初级分离阶段；(2)产物的纯化精制阶段。

初级分离阶段位于细胞培养之后。其任务是分离细胞和培养液、破碎细胞释放产物（如果产物在胞内）、溶解包含体（亦有称“包涵体”的）、复原蛋白质、浓缩产物和去除大部分杂质等。

纯化精制阶段是在初级分离的基础上，用各种高选择性手段（其中主要是各种色谱方法）将目标产物和干扰杂质尽可能地分开，使产物的纯度达到有关的要求，最后制成可以贮藏、运输和使用的产品。

本章论述的细胞破碎和固液分离操作属于初级分离阶段。它们主要影响产物的收率，但在某种意义上也影响产物的纯度，因为如果能在初分离中除掉大部分杂质，特别是一些对后续精制阶段有干扰的杂质，那么产物精制也会变得较容易，纯度也容易得到保证。

在探讨各种分离技术之前，有必要了解一下所分离的对象，就是来自各种生物反应器的细胞悬浮液。这些悬浮液有着共同的性质。

(1)　目标产物浓度普遍比较低，悬浮液中大部分是“水”。

(2)　组份非常复杂，是含有细胞、细胞碎片、蛋白质、核酸、脂类、糖类、无机盐类等多种物质的混合物。

(3)　分离过程很容易发生失活现象，pH 值、离子强度、温度等变化常常造成产物的失活。

(4)　性质不稳定，易随时间变化，如受空气氧化、微生物污染、蛋白水解酶作用等。根据上述性质，分离过程应该做到：迅速加工，缩短停留时间；控制好操作温度和 pH 值；减少或避免与空气接触受污染的机会；设计好各组份的分离顺序。

第二节　细胞破碎

自 80 年代初重组 DNA 技术得到广泛应用以来，生物技术发生了质的飞跃，产品的数量

越来越多，许多具有重大应用价值的产品应运而生，如具有显著医疗作用的胰岛素、干扰素、生长激素、白细胞介素-2等，它们的基因分别在宿主细胞（如大肠杆菌或酵母细胞）内克隆表达成为基因工程产物，从而提高了产量，降低了成本。很多基因工程产物都是胞内物质，分离提取这类产物时，必须将细胞破壁，使产物得以释放，才能进一步提取。因此细胞破碎是提取胞内产物的关键步骤，破碎技术的研究引起基因工程专家和生化工程学者的关注。

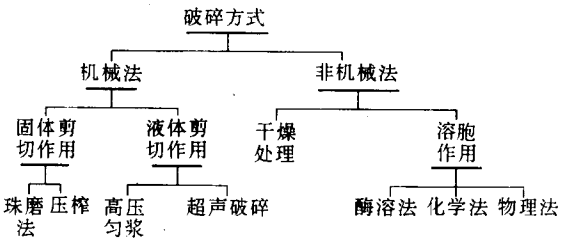


图5-1 细胞破碎方法分类[1,2]

一、细胞破碎技术的分类

细胞破碎的目的是释出细胞内含物，其方法很多，按照是否存在外加作用力可分为机械法和非机械法两大类，图5-1列出了一些主要方法。

机械法中的高速湿法珠磨和高压匀浆已经在工业生产中应用，而非机械法中的酶溶法和化学渗透等方法目前实验室研究开发也相当活跃。本节重点介绍这4种方法和超声破碎法。虽然压榨法和冷冻融化法等在实验室范围经常使用，但其工业化应用受到诸多因素的限制，即使已工业化应用的珠磨法和高压匀浆法也有局限性。目前人们仍在探寻新的细胞破碎方法，如激光破碎法[3]、冷冻-喷射法[4]、高速相向流撞击法[5]等，细胞破碎的研究有待不断深入和完善。

二、几种常用的破碎方法

1. 高压匀浆法

高压匀浆法（High-pressure homogenization）所用设备是高压匀浆器，它由高压泵和匀浆阀组成，图5-2是匀浆阀的结构图。英国APV公司和美国Microfluidics公司均有产品出售。

破碎机理与动力学 从高压室（几百个大气压）压出的细胞悬浮液（见图5-2）经过阀座2的中心孔道从阀座2和阀杆4之间的小环隙中喷出，速度可达几百米每秒。这种高速喷出的浆液又射到静止的撞击环3上，被迫改变方向从出口管流出。细胞在这一系列过程中经历了高速造成的剪切、碰撞以及由高压到常压的变化，从而造成细胞的破碎。阀与阀座的形状、二者之间的距离、操作压力和循环次数等因素都对破碎效果有影响[6]。图5-3是操作压力P和循环次数N对破碎的影响情况。一般说来，增加压力或增加破碎次数都可以提高破碎率，但当压力增加到一定程度后对匀浆阀的磨损较大。

同所有的机械破碎方式一样，高压匀浆法破碎细胞实质上是将细胞壁和膜撕裂，靠胞内的渗透压使其内含物全部释放出来。破碎的难易程度无疑由细胞壁的机械强度决定，而胞内物质的释放快慢则由内含物在胞内的位置决定。例如，胞间质（periplasm）的释出先于胞内质（cytoplasm），而膜结合酶（membrane-bound enzyme）最难释放。

在实验的基础上，研究者们提出了一个破碎动力学方程[7]

$$\ln[R_m/(R_m-R)]=KN^bP^a \qquad (5-1)$$

式中 R 是单位生物量释放出的内含物量(mg/g)，R_m 是 R 的最大值；K 为破碎速度常数，表示破碎的阻力；动力项 P 也可以表示成动能项[5]：

$$\ln[R_m/(R_m-R)]=K'N^b(\rho v^2/2)^a \qquad (5—2)$$

式中 ρ 为悬浮液的密度；v 为射流的速度(压力为 15MPa 时，流速高达 190m/s)。微生物的形态(morphology)和生理状态(physiology)决定了细胞的机械强度，因此上述破碎参数 R_m、K、a、b、P 等)随微生物种类和培养条件的不同而有所差异。例如指数 a 因微生物而异[7,8,9]：

$$a=\begin{cases}2.9 & \text{(酵母)}\\ 2.2 & \text{(大肠杆菌)}\\ 1.77 & \text{(产朊假丝酵母)}\end{cases}$$

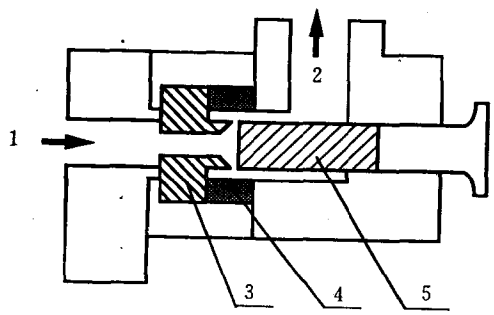


图 5－2　高压匀浆阀的结构简示

1—细胞悬浮液；　2—阀座；　3—碰撞环；　4—阀杆；　5—加工后的细胞匀浆

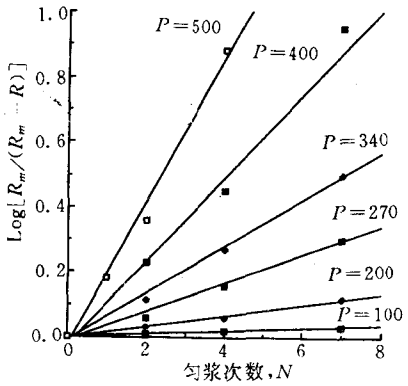


图 5－3　高压匀浆过程的蛋白质释放率 R 与匀浆次数 N 及压力 P 的关系[7]

R_m—最大蛋白质释放率

培养条件，包括培养基(限制型或复合型)、生长期(对数期、静止期)、稀释率等，都对细胞破碎有影响。值得指出的是指数 b 与细胞浓度和培养条件(如稀释率)有关，并非常数[8]。

温控与能耗　人们普遍关心的是活性物质在破碎过程中的失活问题。研究表明蛋白质和酶的失活主要由匀浆过程中产生的热引起[10]。如果能将温度控制在 35℃以下，那么酶活损失可以忽略。对于温度敏感性物质，低温操作是必需的。高压匀浆一般需多级操作，每次循环前往往进行级间冷却。尽管提高压力有利于细胞破碎，但是提高压力需增加能耗(3.5kW/100MPa)，同时为移走产生的热量(23.8℃/100MPa)[1]需要付出代价。机械破碎的能耗主要包括提供动力(如压力)消耗的能量以及低温操作耗费的能量。

存在的问题　除了较易造成堵塞的团状或丝状真菌以及较小的革兰氏阳性菌不适于用高

压匀浆器处理以外，其它微生物细胞都可以用高压匀浆法破碎。另外有些亚细胞器(如包含体，inclusion body)质地坚硬，易损伤匀浆阀，也不适合用该法处理。但最近也有人在实验室用高压匀浆器研究真菌[11]和含有包含体的大肠杆菌[12]的破碎。

2. 高速珠磨法

高速珠磨法(High－speed bead mill)也是一种有效的细胞破碎方法。珠磨机是该法所用的设备，其结构示意图见图5－4。瑞士WAB公司和德国西门子机械公司均制造各种型号的珠磨机。

破碎机理 微生物细胞悬浮液与极细的研磨剂(通常是直径＜1mm的无铅玻璃珠)在搅拌浆作用下充分混合，珠子之间以及珠子和细胞之间的互相剪切、碰撞，促使细胞壁破裂，释出内含物。在珠液分离器的协助下，珠子被滞留在破碎室内，浆液流出，从而实现连续操作。破碎中产生的热量由夹套中的冷却液带走。

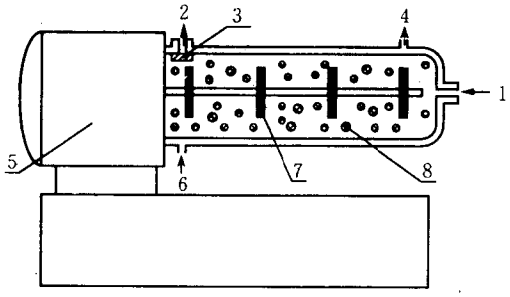


图5－4 水平搅拌式珠磨机的结构简示
1—细胞悬浮液； 2—加工后的细胞匀浆；
3—液珠分离器； 4—冷却液出口； 5—搅拌电机； 6—冷却液进口； 7—搅拌浆；
8—玻璃珠

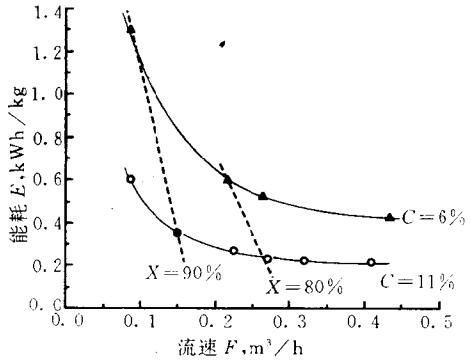


图5－5 水平搅拌式珠磨机破碎酵母细胞过程的能耗 E 与流速 F 及浓度 C 的关系[21]
C—细胞悬浮液浓度(w/w)； X—细胞破碎率
虚线代表一定破碎率下 E 与 F 的关系

表5－1列出了影响珠磨破碎的诸多因素。一旦确定珠磨机的硬件，则只有某些操作参数待定，如转速、进料速度、珠子直径与用量、细胞浓度、冷却温度等。这些参数有各自的变化规律[13~19]，同时也相互联系。图5－5表明进料速度与微生物浓度、破碎率、能耗之间的关系。进料速度的增加虽然能够降低破碎单位重量细胞的能耗，但也会降低细胞的破碎率。

动力学方程 研究表明胞内蛋白的释放符合一级动力学[15,21,22]：

$$\text{间歇操作：}\quad \ln[R_m/(R_m-R)]=\ln(D)=kt \tag{5—3}$$

$$\text{连续操作：}\quad \ln[R_m/(R_m-R)]=k(V/f)=k'/f \tag{5—4}$$

$$D=(1+k_1\tau/j)^j \tag{5—5}$$

式中 t 是破碎时间(s)；k、k'和 k_1 是破碎速度常数(s)；V 是破碎室内悬浮液的体积或破碎室的

有效体积(l)；f 是进料速度(1/s)；τ 是平均停留时间(s)；j 是破碎室相当于全混釜的数目，它反映了破碎室内悬浮液的流动状况或混合特性。

微生物细胞的形态和生理因素决定了细胞壁的化学组成与机械强度，从而决定了细胞破碎的难易程度。显然这些复杂的因素难以用简单的方程来描述，只能通过实验加以区分比较。

表 5－1　湿法珠磨的相关参数[10,20]

设备		产品	生物参数
搅拌器	珠子		
设计	形状	粒子形状	生物类型
直径	表面积	粒子大小	细胞壁组成
叶片/器壁间距	直径	粒子硬度	细胞贮存及菌龄
叶片/叶片间距	均一性	弹性	培养条件
材料	密度	粘度	收获时间
末端线速度	装载量	浓度	
转动稳定性		进料速度	
		停留时间分布	
破碎室	珠液分离器	温度	
		密度	
横截面积/直径	筛孔面积	原料几何形状	
高/长	形状	压力	
自由空间体积	缝隙宽度	消泡剂	
垂直式/水平式	缝隙形状	表面活性剂	
材料	材料		

温控与能耗　珠磨机是采用夹套冷却的方式实现温度控制的，一般情况下能够将温度控制在要求的范围内。珠磨破碎的能耗跟细胞破碎率成正比。提高破碎率，需要增加装珠量，或延长破碎时间，或提高转速，这些措施不仅导致电能消耗的增加，而且产生较多的热量，引起浆液温度升高，从而增加了制冷费，因此总能量消耗增加。实验表明，破碎率＞80%，能耗大大提高(如图 5－5 所示)。不仅仅如此，高破碎率还给后分离带来麻烦。对于可溶性胞内产物的提取，细胞破碎后必须进行固-液分离，将细胞碎片除去。尽管采用高速离心、错流微孔过滤或双水相萃取等技术可以除去碎片，但是破碎率越高、碎片越细小、清除碎片越困难[23~26,41]，并且不得不考虑产物活性损失因此增加的可能性。总之，不管是高压匀浆还是珠磨破碎，都不是以破碎率为基准，而是考虑产物的收率和兼顾上下游过程。

两种方式的比较　高压匀浆法同高速珠磨法相比各有特点：前者操作参数少，易于确定；后者操作参数多，一般凭经验估计，并且珠子之间的液体损失使一次处理 85ml 悬浮液最终只能得到 50ml 左右的浆液。连续操作时珠磨机兼具破碎和冷却双重功能，减少了产物失活的可能性，而高压匀浆器需配备换热器进行级间冷却；其次珠磨法破碎在适当条件下一次操作就能达到较高的破碎率，而高压匀浆往往需循环 2～4 次才行；再者几乎所有种类的微生物细胞都

可以用珠磨机破碎，包括含有包含体的基因工程菌的破壁，质地坚硬的包含体可以充当研磨剂，更有利于细胞破壁，而包含体常常磨损高压匀浆阀。

3. 超声破碎

声频高于 15～20kHz 的超声波在高强度声能输入下可以进行细胞破碎，其破碎机理尚未弄清楚，可能与空化现象(cavitation phenomena)引起的冲击波和剪切力有关。空化现象是在强声波作用下，气泡形成、长大和破碎的现象。超声破碎(Ultrasonication)的效率与声频、声能、处理时间、细胞浓度及菌种类型等因素有关[1]。

研究者们[27,28]对啤酒酵母超声破碎的实验结果进行分析和关联，得到如下关系式：

$$1-S_p=\exp(-K_pT) \tag{5—6}$$

$$1-S_p=\exp\{-[(P-P_0)/\alpha]^\beta\} \tag{5—7}$$

将(5—6)、(5—7)式比较

$$K_p=[(P-P_0)/\alpha]^\beta \tag{5—8}$$

$$K_p=b'(P-P_0)^{0.9} \tag{5—9}$$

S_p 为蛋白质释放率；K_p 为蛋白释放常数(min^{-1})；T 为处理时间(min)；P_0 是空化作用的最低极限功率；P 是输入功率[erg/(g.s)]；α，β 为常数，β 的理论值为 0.895。

超声破碎在实验室规模应用较普遍，处理少量样品时操作简便，液量损失少。但是超声波产生的化学自由基团能使某些敏感性活性物质变性失活，噪声令人难以忍受，而且大容量装置声能传递、散热均有困难，因而超声破碎的应用潜力有限。

4. 化学渗透法

表 5－2　微生物细胞的结构特性[10]

微生物类型	破碎难度	主要层次	排阻分子量
革兰氏阴性	难	外层膜 粘　肽 内层膜	700
革兰氏阳性	中等	细胞壁 原生质膜	1200
酵　母	很难	细胞壁 原生质膜	700

某些有机溶剂(如苯、甲苯)、抗生素、表面活性剂(SDS、Triton X－100)、金属螯合剂(EDTA)、变性剂(Chaotropic agents)(盐酸胍，脲)等化学药品都可以改变细胞壁或膜的通透性，从而使内含物有选择地渗透出来，这种处理方式称为化学渗透法(Chemical permeation)。

作用机理　化学渗透取决于化学试剂的类型以及细胞壁和膜的结构与组成[10,29]，表 5－2 列出不同类型微生物细胞的结构和化学组成。各种化学试剂对不同种类细胞作用的情况见表 5－3 所示。不同试剂对各种微生物细胞作用的部位和方式有所差异。

(1)　EDTA 作为螯合剂，可用于处理革兰氏阴性菌(如 E. coli)，对细胞外层膜有破坏作用。革兰氏阴性菌的外层膜结构通常靠二价阳离子 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 结合脂多糖(lipo－polysac－

charides)和蛋白质来维持，一旦 EDTA 将 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 螯合，大量脂多糖分子将脱落，使外层膜出现洞穴。这些区域由内层膜的磷脂(phospholipid)来填补，导致该区域通透性增强。

(2) 有机溶剂常用的是甲苯，它能溶解细胞膜的磷脂层。

(3) Triton X－100 是非离子型清洁剂，对疏水性物质具有很强的亲和力，能结合并溶解磷脂，因此其作用部位主要是内膜的双磷脂层。Triton X－100 常与其它试剂混合使用。

(4) 盐酸胍(Guanidin HCl)和脲(Urea)是常用的变性剂。一般认为胍能与水中氢键作用，削弱了溶质分子间的疏水作用，从而使疏水性化合物溶于水溶液，如胍能从大肠杆菌膜碎片中溶解蛋白。

表 5－3 针对不同细胞的化学渗透处理方式[10]

细胞类别	变性剂	清洁剂	溶剂	酶	抗生素	生物试剂	螯合剂
革兰阴性	X	X	X	X	X		X
革兰阳性		X	X	X			
酵　母	X	X	X	X	X	X	
植物细胞		X	X		X	X	
巨噬细胞		X	X			X	

应用 化学渗透法以前主要用来检测胞内酶活性。经化学试剂处理后，检测酶活性的底物等小分子可以渗透到胞内，这样就不必释出胞内酶了。如 β－半乳糖苷酶(β－galactosidase)的检测，用甲苯对 E. coli 进行预处理，检测底物是邻硝基苯－β－*D* －半乳糖苷(*o* －nitrophenyl －β－*D* －galactoside)。化学渗透法用于释放胞内物质的研究是近几年来才引起人们普遍关注的。目前实验室应用较多的是用变性剂盐酸胍或脲处理 E. coli 基因工程菌，渗透出重组蛋白来。盐酸胍不仅能改变细胞的通透性，而且能溶解不溶性重组蛋白(如包含体)，并在其它试剂的配合下使其二硫键断裂，变性解离成亚基，从而释放出来。除去变性剂和杂蛋白后，在一定条件下恢复肽链内或肽链间的二硫键，再折叠复性成具有活性的蛋白质立体结构。

根据各种试剂的不同作用机理，将几种试剂合理地搭配使用能有效地提高胞内物质的释放率。实验表明单独用 0.1mol/L 胍处理 E. coli 仅释出约 1%的胞内蛋白，用 0.5% Triton X－100 释放率为 4%。二者合用，在同样的时间内胞内蛋白释放率达到 53%左右，同样的收率需要 4mol/L 的胍[30]。一般认为胍溶解了细胞外膜，使内膜暴露于 Triton 中，双磷脂层遭受损伤，结果大大改变了细胞的通透性。

与机械法的比较 化学渗透法与机械法相比具有如下优点。

(1) 对产物释出具有一定的选择性：化学试剂处理能使一些分子量小的溶质(如多肽和小分子的酶蛋白)透过，而分子量大的物质(如核酸)则被阻滞在胞内。控制条件可以有选择地释出位于细胞内不同部位的产物，例如用 0.2mol/L 胍处理 E. coli C600－1，5h 后 80%位于胞间质的 β－内酰胺酶(β－lactamase)释放出来，而总的蛋白释放率仅为 4%[31]。

(2) 细胞外形保持完整；碎片少，有利于后分离。

(3) 核酸释出量少，浆液粘度低，便于进一步提取。

化学渗透法也有自身的缺陷。

(1) 时间长，效率低：一般胞内物质释放率不超过 50%，而处理时间则长达 2h 以上，所

以往往需添加还原剂(如巯基乙醇,β-mercaptoethanol)作保护,以防活性损失太多。通常为提高收率而采用较高的试剂浓度,例如用 6mol/L 盐酸胍或 8mol/L 脲处理 E.coli 基因菌,试剂用量大,成本高,也给后处理带来不便。

(2) 化学试剂的毒性:有些化学试剂本身就有较强的毒性,同时对产物也有毒害作用,进一步分离时需要用透析等方法除去这些试剂。

(3) 通用性差:某种试剂只能作用于某些特定类型的微生物细胞。

5. 酶溶法

酶溶法(Enzymatic lysis)就是用生物酶将细胞壁和细胞膜消化溶解的方法。常用的溶酶有溶菌酶(Lysozyme)、β-1,3-葡聚糖酶(glucanase)、β-1,6-葡聚糖酶、蛋白酶(protease)、甘露糖酶(mannanase)、糖苷酶(glycosidase)、肽链内切酶(endopeptidase)、壳多糖酶(chitinase)等,细胞壁溶解酶(Zymolyase)是几种酶的复合物。溶菌酶主要对细菌类有作用,其它酶对酵母作用显著。

自溶(Autolysis)是一种特殊的酶溶方式。控制条件(温度、pH、添加激活剂等)可以增强系统自身的溶酶活性,使细胞壁自发地溶解[32~34]。

作用机理 溶酶同其它酶一样具有高度的专一性,蛋白酶只能水解蛋白质,葡聚糖酶只对葡聚糖起作用,因此利用溶酶系统处理细胞必须根据细胞的结构和化学组成选择适当的酶,并确定相应的使用次序。Asenjo 等人[10,35~37]对酵母细胞的酶溶进行了深入的研究,分析了溶解机理,建立了数学模型,设计了反应器,图 5-6 中的(b)是 Asenjo 提出的酵母细胞表面结构模式,细胞壁由甘露糖-蛋白质层(2)和葡聚糖层(4)组成。加入溶酶后,蛋白酶打开了(2)层上的蛋白质-甘露糖结构,使二者溶解,裸露出的(4)层受到葡聚糖酶攻击,最后只剩下原生质体,这时若缓冲液的渗透压变化,则细胞膜破裂,释出胞内质。

应用 用酶溶法剥离细胞壁,将原生质体进行融合,这是细胞工程常用的方法。除此之外的其它应用前景见表 5-4。使用溶酶系统时需注意控制温度、pH、酶用量及使用次序等。

存在的问题 在溶酶系统中,产物抑制是一个不容忽视的问题,甘露糖对蛋白酶有抑制作用,葡聚糖抑制葡聚糖酶。产物抑制可能是导致胞内物质释放率低的一个重要因素。目前酶溶法仅限于实验室规模应用,虽然酶溶法具有选择性释放产物、核酸泄出量少、细胞外形完整等优点,但是这种方法也存在明显的不足:一是溶酶价格高,限制了大规模利用,若回收溶酶以降低成本,则又增加了分离纯化溶酶的操作;二是酶溶法通用性差,不同菌种需选择不同的酶,而且也不易确定最佳的溶解条件。

机械法与非机械法的比较 以高压匀浆和珠磨为代表的机械法与以化学渗透和酶溶为代表的非机械法相比各有特点,表 5-5 对二者进行了比较。

表 5-4 溶酶系统的一些应用潜力[10]

1) 释出克隆的胞内蛋白;
2) 制取特殊的壁葡聚糖聚合物;
3) 与机械细胞破碎法协同作用;
4) 从细胞内不同位置选择性地释放产物。

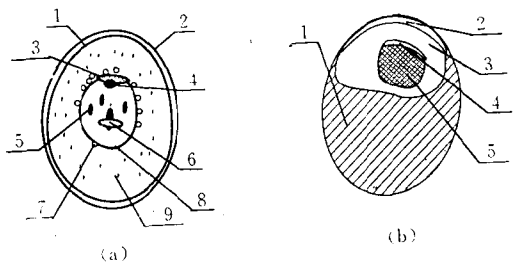


图 5－6　酵母细胞的结构简示图

(a) 内部结构：1—细胞膜；2—细胞壁；3—中心体；4—中心染色质；5—染色体；6—核仁；7—线粒体；8—核膜；9—细胞质

b) 表层结构：1—外表面；2—甘露糖-蛋白质层；3—裸露的葡聚糖层表面；4—葡聚糖层；5—细胞膜表面

表 5－5　机械破碎法与非机械法的比较

比较项目	机械法	非机械法
破碎机理	切碎细胞	溶解局部壁膜
破片大小	碎片细小	细胞碎片较大
内含物释放	全部	部分
粘度	高(核酸多)	低(核酸少)
时间,效率	时间短,效率高	时间长,效率低
设备	需专用设备	不需专用设备
通用性	强	差
经济	成本低	成本高
应用范围	实验室,工业范围	实验室范围

三、细胞破碎技术研究的发展方向

从前面的介绍中不难看出，不管是机械法还是非机械法，各种方法都有自身的局限性。机械法因高效、价廉、简单而得以工业化应用，但敏感性的物质失活问题、碎片去除以及杂蛋白太多等问题仍有待解决，因此细胞破碎技术远未完善。近几年这方面的论文仍然不少，有的已超出了单一的细胞破碎领域，而与上游或下游过程相联系。

1. 多种破碎方法相结合

化学法与酶法取决于细胞膜壁的化学组成，机械法取决于细胞结构的机械强度，而化学组成又决定了结构的机械强度，组成的变化必然影响到强度的差异，这就是化学法或酶法与机械法相结合的原理。

例一：机械破碎前预先用硫醇(thiol)培养酵母细胞，可以大大提高胞内蛋白的收率。原因是被硫醇激活的糖苷酶除去了细胞壁中的糖，使壁强度减弱[10]。

例二：用 Zymolyase 预处理面包酵母，然后高压匀浆。95MPa 压力下匀浆 4 次，总破碎率接近 100%，而单独采用高压匀浆法，同样条件下破碎率只有 32%[38]。

2. 与上游过程相结合

在发酵培养过程中，培养基、生长期、操作参数(如 pH 值、温度、通气量、稀释率)等因素对细胞破碎都有影响，因此细胞破碎与上游培养有关。另一方面用基因工程的方法对菌种进行改造也是非常重要的，这方面的工作包括以下几方面。

(1)　包含体的形成。包含体是重组蛋白在原核生物细胞内表达后形成的不溶性组分，细

胞破碎后包含体可用密度梯度离心收集，再将其变性溶解，透析除去变性剂，蛋白质折叠复性。当然也可用化学渗透法处理含有包含体的宿主细胞(E. coli)。

(2) 克隆噬菌体溶解基因。在细胞内引进噬菌体基因，控制一定条件(如温度)，细胞自内向外溶解，释放出内含物[39]。

(3) 耐高温产品的基因表达。在破碎和分离过程中，为防止产品失活而消耗的制冷费是相当可观的。如果产品能表达成耐高温型，杂蛋白仍然保持原特性，那么在较高的温度下就可以将产品与杂质分开，这样既节省了冷却费用，又简化了分离步骤。

3. 与下游过程相结合[40~45]

细胞破碎与固-液分离紧密相关，对于可溶性产品来讲，碎片必须除净，否则将造成层析柱和超滤膜的堵塞，缩短设备的寿命。因此必须从后分离过程的整体角度来看待细胞破碎操作，机械破碎操作尤其如此。

第三节 包含体产物的分离[46~52]

当分子生物学家成功地将外源基因导入 E. coli 等宿主细胞并得到了较为稳定的表达后，人们以为生物高技术产品的工业化已经没有问题了。但是不久就发现，将 E. coli 表达的产物提取出来还要克服难以预料的困难。不仅是因为大部分产物不能渗透出细胞，需要人工地进行细胞破碎来释放产物，而且是因为相当多的蛋白质产物(如 γ-干扰素、白细胞介素-2、人生长激素等)在胞内凝集成没有活性的固体颗粒——包含体(Inclusion bodies)。包含体基本是由蛋白质构成，其中大部分(占 50%以上)是克隆表达的产物，这些产物在一级结构上是正确的，但在立体构型上却是错误的，因此没有生物学活性。要分离出具有活性的蛋白质，一般要经历下列步骤：

破碎细胞→分离出包含体→溶解包含体→目标产物的构型复原

包含体形成的原因比较复杂，到目前为止还不完全清楚。Mitriki 和 King[47]认为包含体的形成是外源蛋白质在生成的过程中，缺少某些协助因子或者由于周围的物理环境(如温度)不适，使其难以连续进行次级键的形成，中间产物相互凝集而积累成包含体。

这些包含体有时可以在相差显微镜下观察到，是深色的点，因此包含体有时也称为光折射体。图 5-7 是大肠杆菌产生的一种包含体的简示，其中两端黑色的点就是包含体。它的颗粒尺寸范围大约在 0.5～1μm，比较坚硬，用高压匀浆机破碎细胞时常造成匀浆阀的磨损。一般的水溶液很难将其溶解，只有在变性剂溶液(如盐酸胍、脲)中才能溶解。在这些溶液中，溶解的蛋白质呈变性状态，即所有的氢键、疏水键全被破坏，疏水侧链完全暴露，但一级结构和共价键不被破坏。因此当除去变性剂时，一部分蛋白质可以自动折叠成具有活性的正确构型，这一折叠过程称为蛋白质的复性。

从细胞破碎到蛋白质复性可以走不同的工艺路线，文献上已有的工作大致可分为以下几种：

(1) 机械破碎(高压匀浆、高速珠磨)→离心法提取出包含体→加变性剂溶解→除变性剂复性

(2) 机械破碎→膜分离除可溶性蛋白→变性剂溶解包含体→除变性剂复性

(3) 化学破碎(加变性剂)→离心除细胞碎片→除变性剂复性

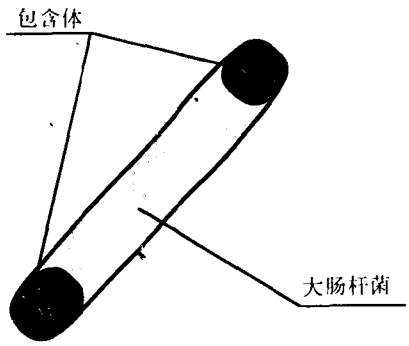


图 5-7 大肠杆菌包含体简示图

路线(1)的特点是利用了包含体与细胞碎片的密度差,用离心法将包含体与细胞碎片和可溶性蛋白质分开,获得了干净的包含体,再对包含体溶解复性。这样首先就摆脱了大量的杂蛋白、核酸、热原、内毒素等杂质,使后面的分离纯化简单了。从这个角度讲,包含体的形成对分离纯化亦有好处。缺点是要经过几次离心才能除去大部分细胞碎片,加工时间较长。

路线(2)应用了膜分离技术,用微孔膜除去可溶性蛋白质,但细胞碎片却和包含体一起被膜挡住,难以分开;而且膜的堵塞和浓差极化常常导致可溶性蛋白质的滞留,因此这条路线的问题较多。膜分离的优点是封闭式操作,不污染环境也不受环境污染,能量消耗也比离心法少。

路线(3)是用化学法破菌,所采用的试剂既可以破菌又可以溶解包含体,将两道工序合为一道,节省了设备和时间,比前两者更适合于实验室操作。缺点是所有的可溶性杂质都没有被除去,混杂在产物中间,给后分离带来困难。

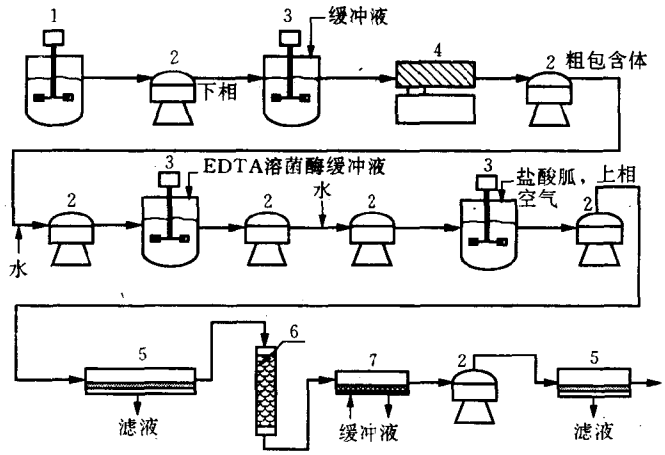


图 5-8 包含体产物分离工艺举例

1—发酵罐; 2—离心机; 3—搅拌混合罐; 4—高压匀浆机; 5—超滤器; 6—凝胶过滤柱; 7—透析器

图 5-8 是牛生长激素(BGH)的分离提取工艺,采用的是路线(1)的方案。来自发酵罐的菌体经过离心除去培养液后加入缓冲液悬浮,通入高压匀浆机反复破碎 3 次。匀浆经过离心和水

洗除去细胞碎片，再添加溶菌酶、EDTA 和促溶剂以除去脂蛋白和未破碎的细胞。包含体经离心沉淀和水洗后进行变性溶解，溶解剂为 6mol/L 盐酸胍。溶解的同时通入空气氧化以打断错误连接的双硫键。离心除去沉淀，含变性蛋白质的上清液经超滤浓缩后过凝胶柱除去杂蛋白，再加入复性缓冲液进行透析复性。复性过程中产生的絮凝沉淀用离心除去。从这个实例可以看出：包含体产物的分离工艺确实比较复杂，其中包括了一系列的固-液分离过程。

复性操作 使蛋白质复性大致有两种方法：一种是将溶液稀释，导致变性剂的浓度降低，蛋白质开始复性。此法很简单，只需加入大量的水或缓冲液，缺点是增大了加工的液量，降低了蛋白质的浓度。例如在 6mol/L 盐酸胍中溶解的浓度为 10mg/ml 的蛋白质，需稀释 50 倍才使浓度降至 0.2mg/ml。

另一种办法是用透析、超滤或电渗析除去变性剂，其中透析法常在实验室中使用，将溶液对水或缓冲液透析，变性剂透过膜被除去，里面的蛋白质开始复性。此法不增加液体体积，不降低蛋白质浓度，但时间较长，易形成蛋白质沉淀。超滤或电渗析比透析速度快，但要注意这两种过程都存在蛋白质的失活问题。

有时包含体中蛋白质含有两个以上的二硫键，其中有可能发生错误连接，在这种情况下，需要在复原之前用还原剂打断—S—S—键，使其变成—SH，复性后加入氧化剂使两个—SH 形成正确的双硫键。在图 5－8 的分离实例中，包含体中的克隆产物就有错误的双硫键，因此要进行氧化断键操作。

常用的氧化剂有：谷胱甘肽、空气（碱性条件下）、半胱氨酸 Cysteimine (Cysteine)。

常用的还原剂有：二硫苏糖醇（1～50mmol/L）、β 巯基乙醇（0.5～50mmol/L）、还原型谷胱甘肽（1～50mmol/L）。

蛋白质的复性是十分复杂的过程，其中目标产物的复性率非常低，一般不超过 20%。原因是当变性剂移走后，蛋白质分子可能重新聚合。生成二聚体、三聚体或多聚体，甚至形成变性沉淀物。图 5－9 是红血球碳酐酶复性中盐酸胍浓度与蛋白质浓度对复性的影响。图中有复性区、多聚体区和絮凝沉淀区。降低盐酸胍浓度或增加蛋白质浓度都易使系统进入多聚体区和絮凝沉淀区。要减少复性的损失，就必须使操作处于复性界限（Refolding limit）之上。图 5－9 所对应的是不含双硫键的简单蛋白质。对于克隆表达的一些结构复杂的基因工程药物蛋白质，其复性过程更为复杂，受很多因素的影响。因此，研究复性的机理，合理地控制复性过程，对于提高包含体产物收率具有重要作用。

近年来人们正在探索几种方法来提高蛋白质的复性收率，如反胶束法复性、单克隆抗体协助复性及保护协助复性等。

第四节 离心沉降[53～57]

离心是实现固液分离的主要手段。离心分离的原理是利用固体和液体之间的密度差。一般说来，细胞、细胞碎片、蛋白质沉淀物、包含体及病毒颗粒的密度都大于其相应的环境液体，可以用离心的方法使其沉降，但沉降的难易还取决于其它几种因素。著名的斯托克斯（Stokes）公式表达了在理想状态下，固体颗粒在离心场中的沉降速度与影响因素的关系。

$$u_c=\frac{d^2(\rho_s-\rho_L)}{18\mu}r\omega^2 \qquad (5—10)$$

式中　u_c——颗粒沉降速度；

d——颗粒直径(假定为球形)；

ρ_S——固体密度；

ρ_L——液体密度；

μ——液体粘度；

r——离心半径；

ω——角速度。

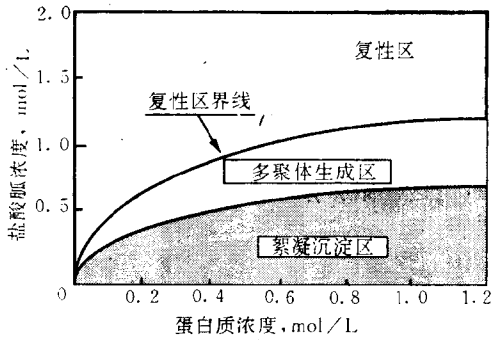


图 5－9　红血球碳酐酶复性操作中变性剂与蛋白质浓度对复性的影响

从式(10)中可看出：

(1)　密度差($\rho_S-\rho_L$)越大，离心沉降速度越快；

(2)　在密度差($\rho_S-\rho_L$)存在下，固体颗粒尺寸越大，越容易离心；

(3)　液体粘度 μ 越大，越不容易离心。例如当溶液中含有大量 DNA 时，细胞碎片就不容易沉降；

(4)　离心力($r\omega^2$)的大小对固液分离很有影响，细胞悬浮液或细胞匀浆中的颗粒尺寸都不大，与液相的密度差也不大，而且液体粘度常常较大，所以要通过增大离心力来提高分离效率。由于离心机半径 r 过大会造成不平衡和振动，一般高速离心机都采用增加转速来增大分离能力。为衡量离心力的大小，常用分离因数来描述：

$$a=\frac{r\omega^2}{g} \qquad (5—11)$$

式中 a 是分离因数；g 是重力加速度。

按分离因数的大小分类，可分为低速离心($a<3000$)，高速离心($a=3000\sim50000$)和超速离心($a>50000$)。

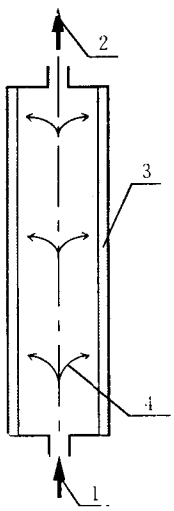


图 5－10　管式离心机的结构简示

1—生物悬浮液；　2—离心后的清液；　3—沉积在转鼓上的固体；　4—固体从悬浮液中沉积

生化分离所用的离心机大部分是高速离心机。常用的有管式离心机和碟式离心机两种。图

5－10 是管式离心机的简示图。转鼓是一个圆筒，直径不大，但转速很高，分离因数可达几万以上，适用于固体颗粒比较小、浓度较低的场合。悬浮液从空心转轴的一端进入。固体在离心场中向转鼓沉积，上清液从转轴的另一端出去。有的转鼓的边缘有出口，可以连续排出含固体的重相，但这样做会损失大量液体，而且易堵塞出口。因此一般并不连续排出固体，固体是间歇清洗掉的。

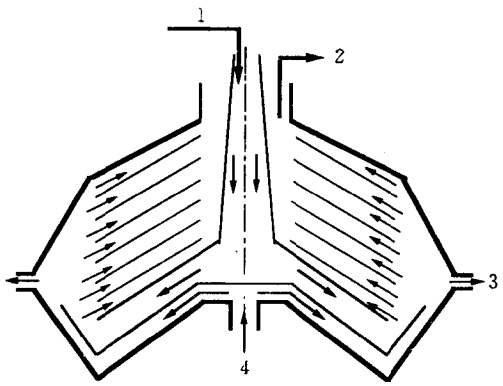


图 5－11　碟式离心机的结构简示
1—生物悬浮液；　2—离心后的清液；　3—排放的固体；　4—循环液

图 5－11 是碟式离心机的简图。机内装有多层碟片，片间的距离只有 0.3mm 左右。悬浮液由轴中心加入，固体在离心力的作用下沿最下层的通道积累在离心机的最大半径处。离心机间隔一段时间打开半径处的固体排泄口以排除固体。流体则沿着碟片向上侧流动，从上部的出口排出。其中倾斜的碟片对固液起着进一步分离的作用：当固体颗粒被带进碟片中时，在离心力作用下会接触到上面的碟片，形成固体流动层沿碟片流下，从而防止了出口的液体夹带固体。这种离心机还带有回流装置。

碟式离心机最大分离因数可达 15000，得到的固相含量可达 15%～20%。若需更大分离因数或更高的固含量，则要使用管式离心机。

生化工业上应用的离心机的种类很多，如分室式离心机(Chamber bowl centrifuge)、倾析式离心机(Decanter centrifuge)、离心过滤机(Filter centrifuge)等。相对比较起来，碟式离心机的应用比较广泛。它分离因数大，流量较大，可以自动排泄固体。其缺点是不容易清洗，排放固体时损失一部分液体，造价也较高。

对不同的离心机，可以根据要分离的细胞悬浮液物性和离心机结构参数及转速，计算其最大允许的进料量。例如碟式离心机的最大允许流量 Q 为：

$$Q=v\omega^2 Z \tag{5—12}$$

其中 ω 是转速，v 是固体颗粒的自然沉降速度，常常需要用实验测定，亦可以粗略估算：

$$v=\frac{d^2(\rho_s-\rho_L)}{18\mu}\cdot g \tag{5—13}$$

ρ_S 是固体的密度，ρ_L 是液体的密度，d 是颗粒直径。Z 与碟式离心机的结构有关：

$$Z=\frac{2\pi n}{g}(R_0^3-R_i^3)\mathrm{cotg}(\theta) \tag{5—14}$$

其中 n 为碟片数；R_0 和 R_i 为碟片的外径和内径；θ 为碟片的角度。

计算举例：

用碟式离心机分离大肠杆菌悬浮液。离心转速＝8400r/min，角速度 $\omega=880s^{-1}$，碟片数

$n=72$，碟片角 $\theta=38°$，碟片内径 $R_i=0.036$m，外径 $R_e=0.081$m。经测量，固体密度 $\rho_s=1050$kg/m³，液体密度 $\rho_L=1020$kg/m³，液体粘度 $\mu=0.00102$kg/m.s。大肠杆菌最小的颗粒尺寸 d 为 0.8μm。

根据式(5--12)、(5--13)和(5—14)计算，流量 $Q=0.273$m³/h，即应把流量控制在 0.273m³/h 以下才能达到分离的要求。

离心法分离固体和液体的优点是技术容易掌握，分离结果的重复性好。通过增加转速和延长离心时间，可以使一些比较难过滤的物质(如细胞碎片)沉降下来。其缺点是难以除尽密度较小的膜片，若直接取上清液作为层析柱进料则易使柱堵塞。

从中试和生产的角度讲，离心机的投资很高，噪声较大，易产生气溶胶污染环境。但它的操作容易控制，结果的重复性也比过滤好。

第五节　微孔膜过滤[58~67]

过滤是压力推动的分离过程。它用一多孔介质，根据流体各组份的尺寸大小不同来进行筛分。传统的过滤介质如滤布和金属丝网等不适合用于过滤微米级大小的细胞、细胞碎片和生物大分子。高分子聚合物膜的出现使过滤在生物分离领域获得了广泛的应用。

目前有 3 种膜过滤：

(1)　微孔过滤(简称"微滤")　用于分离固体颗粒，如细胞、细胞碎片、包含体及蛋白质沉淀物；

(2)　超滤　用于浓缩大分子物质，如蛋白质、核酸、多糖；

(3)　反渗透　用于从小分子如抗菌素、氨基酸溶液中脱除水分。

根据膜的公称孔径(NPD)，可将膜分类为微孔膜(0.1～10μm)、超滤膜(0.001～0.1μm)和反渗透膜(<0.001μm)。在实际应用时，超滤膜是以其"切割分子量(MWCO)"来衡量其孔径大小的。所谓 MWCO 指的是该膜具有挡住 90%或 95%的该分子量标准试验物的能力。超滤膜的常用规格有：1 万、10 万、30 万 MWCO。微孔膜的常用规格有：0.2μm、0.45μm、0.6μm。

微滤的优缺点　微滤和离心一样，都可用于生物悬浮液的分离。和离心相比，微滤的优点是可以很容易做到封闭式操作，不受环境污染、也不污染环境，所用设备投资少，操作过程安全，加工量可大可小，十分方便。对于一些由于密度差小而难以离心的固体，用微滤可以完全除去。经过微滤的液体可以作为层析色谱柱进料，而即使是经过高速离心的上清液也常常需要先经过一遍膜过滤才能作为进料。

但是微滤技术却比离心难以掌握，影响因素很多。实验室操作时就常常出现颗粒的泄漏和膜的堵塞等问题，在生产中也常常需要有经验的工人去操作。因此，就稳定性来说，还是离心好一些。但如能掌握好膜分离技术，膜的优越性还是能充分发挥的。

掌握好膜过滤技术，要注意以下几点。

(1)　选择好合适的膜　生物悬浮液中含有大量的蛋白质和脂类，应尽量选择不与它们发生吸咐的膜。某些聚砜类的膜由于未进行表面处理，易与蛋白质发生不可逆吸咐，导致膜的污染堵塞(堵塞机理的一种)，造成过滤速度低、蛋白质损失。很多研究人员选择膜时愿意选择抗堵塞、性能好的亲水膜。

膜的孔径是供选择的一个参考，但要注意：高分子聚合物膜的孔道大小不匀，实际上有一

个孔径分布，如 0.2μm 的膜很可能存在着一些＞0.6μm 的孔。因此，在刚刚开始过滤时会有少量颗粒透过，而且正由于高分子膜的孔道大小不一、交叉杂乱，孔道的堵塞也容易发生。根据作者的经验，选膜时尽量选小一点孔径的，如过滤尺寸为 1μm 的细胞，可选 0.2μm 孔径的膜，而不选 0.6μm 的。有时用超滤膜过滤菌丝体的效果可能更好一些。当然，孔径过小会导致流量下降，但一般说来，膜的堵塞引起的流量下降是常常见到的。

膜材料的新发展——无机陶瓷膜 我们面临的时代是材料科学迅速发展的时代。有机高分子膜的出现推动了生物工程和其它学科的发展，而今无机陶瓷膜的出现又为生化分离提供了更有潜力的工具。

从结构上讲，膜是一很薄的薄片。大部分用于过滤的“膜”实际上是由多孔支撑体和其表面只有几十微米左右厚的膜层组成的。无机陶瓷膜就是在多孔陶瓷的表面经过特殊处理而形成的孔径均匀的膜，它和有机高分子膜相比有如下优点：

1） 孔径比较均匀，过滤效果好；

2） 不与蛋白质和脂类发生杂吸附，抗堵塞性能好；

3） 耐蒸气灭菌，耐酸碱和有机溶剂，这是有机膜望尘莫及的；

4） 坚固耐用、使用寿命长，适合于工业生产的需要；

5） 可以反向加压清洗过滤中形成的滤饼层。

无机膜的缺点是造价比有机膜高，制造工艺还不完善，它在生化分离中的应用尚有待于研究与开发。

（2） 选择合适的操作条件 过滤的基本方程式是达西公式，可以表示为：

$$v=\frac{\Delta P}{\mu(R_c+R_m)} \tag{5—15}$$

式中 v 是过滤速度；ΔP 是压力差；μ 是滤液的粘度；R_c 是滤饼的阻力；R_m 是过滤介质（膜）的阻力。

从式中可见，在 ΔP 恒定下，滤饼厚度的增加（R_c 增加）会降低过滤速度。因此保持过滤速度不变的一个办法就是设法阻止滤饼的生成，或者维持滤饼的厚度不增加。如果 R_m 和 μ 不发生变化，那么过滤速度就会恒定。增加 ΔP 的作用常常有限，原因是对于可压缩的滤饼如细胞、碎片，ΔP 增加会加大 R_c。

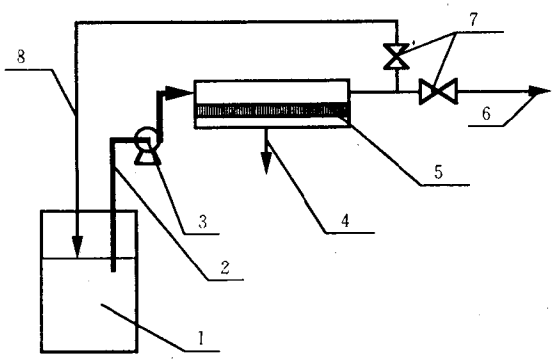


图 5－12 泵循环式切向流膜过滤

1—储罐； 2—生物悬浮液进料； 3—泵； 4—滤液； 5—膜滤器； 6—浓缩液； 7—阀门； 8—循环的浓缩液

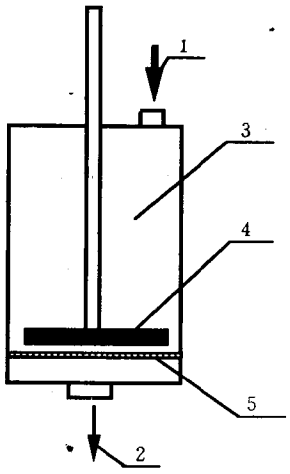


图 5－13　搅拌式切向流膜过滤

1—生物悬浮液；　2—滤液；　3—膜滤器；4—搅拌桨；　5—膜

切向流过滤　切向流过滤(又称错流过滤、交叉流过滤、十字流过滤，Cross－Fiow Filtration)是一种维持恒压下高过滤速度的技术。它的操作是使悬浮液在过滤介质表面作切向流动，利用流体的剪切作用将过滤介质表面的固体移走。当移走固体的速率与固体沉积的速率相等时，过滤速度就近似恒定。控制不同的切向流速度，就可以得到不同的过滤速度。

显然，切向流过滤的高速度是通过外加的能量实现的。由于生物产品加工要求速度快，而且其中的固体所形成的滤饼的比阻力又很大，因此切向流过滤比传统的过滤(与切向流过滤相对应，被称为封头过滤，即 Dead－End Filtration)要优越。切向流过滤可以用 3 种方式获得。

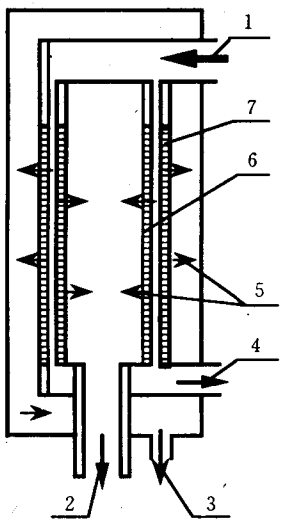


图 5－14　旋转式切向流膜过滤

1—生物悬浮液；　2—转子腔的滤液；　3—定子腔的滤液；4—滤液透过转子和定子上的膜；　5—转子膜；6—定子膜

(a)　用泵打循环使悬浮液流经膜滤器，如图 5－12 所示，悬浮液在快速流过膜表面时产生的剪切作用阻止固体的沉积。此法适合于大规模生产，可用几个膜滤器并联或串联使用。缺点是悬浮液在流动过程中有压力损失，造成过滤压降沿流路变小，能量消耗较大，流路中固体

积累程度不一。在有些情况下会出现某部分流路被固体堵塞的现象，减小过滤面积。

(b) 在膜的表面加以搅拌造成流动，如图 5－13 所示。这种方式只用于实验室小规模应用，处理的液量较少。它的特点是灵活、操作方便。缺点是过滤面积小，剪切力不均匀。

(c) 使膜相对于悬浮液运动，如将膜附于圆筒上高速旋转，如图 5－14 所示。此法不同于前两种，它是使膜运动，同时也使流体运动。由于环隙小、内圆筒旋转，导致环隙中的流动呈“泰勒旋涡”(Taylor's vortices)，因而产生强烈的剪切作用，单位膜面积的过滤速度很高。其缺点是难以放大，设备投资较大。

目前几乎所有用膜进行的生化固-液分离都采用切向流的方式。图 5－15 是用(a)的方式过滤某细菌发酵液时，不同切向流速度对过滤速度的影响。随着流动速度的加快，过滤速度(flux)亦加快。一般认为，过滤速度($flux$)与流动速度(u)的指数呈正比关系[65]，即：

$$flux \propto u^{0.33} \quad \text{(层流)}$$

$$flux \propto u^{0.8} \quad \text{(湍流)}$$

虽然增加流速确实可以提高过滤速度，但符合上面公式的实验数据并不多，而且文献上的公式大都是经验公式。造成这种情况的原因是对切向流过滤的控制机理还不十分清楚，有的认为是象超滤那样属表面浓度极化(Concentration polarization)控制，有的认为是象传统过滤那样属于滤饼比阻力控制。在生物悬浮液的切向流过滤中，增加压力所起的作用是有限的，主要是大部分生物固体(细胞、细胞碎片、蛋白质和核酸沉淀)都属于可压缩固体，增加压降常常使已形成的滤饼进一步压缩，使过滤阻力进一步加大。

切向流过滤的缺点有以下几方面。

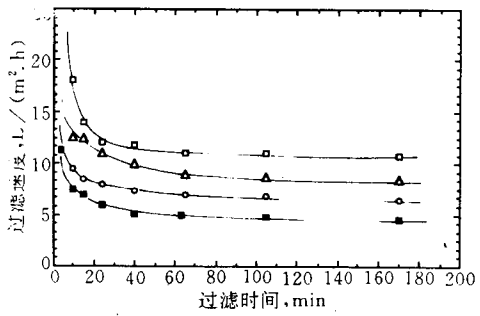


图 5－15 切向流过滤中流动速度对过滤速度的影响[58]

—0.08m/s；○—0.15m/s；△—0.30m/s；□—0.50m/s

1) 它所产生的剪切作用易使蛋白质产物失活，流速越快失活越严重，因而难以用提高剪切力的方法来提高过滤速度。

2) 能耗比较高，大部分用来使流体产生快速流动。如果操作不当，并不比离心节省能量。

3) 它不能避免膜的污染和堵塞。因此当膜的阻力增大时，无法防止过滤速度的下降。

脉冲反洗式切向流过滤 如果在切向流过滤中间歇地在膜的背面加一反压，迫使部分滤液反透过膜以冲掉膜上的固体沉积和膜孔中的堵塞物，接下去的过滤速度就会很高。图 5－16 就是这种被称为脉冲反洗式切向流过滤的一种装置，细胞悬浮液在泵的循环下经过膜滤器作切向流过滤。在滤液的出口处设有两个电磁阀，受时间继电器的控制。当过滤进行到一定时间后，滤液阀关闭，压缩空气阀开启。在反压作用下，一部分滤液反透过膜进行清洗。清洗后阀门切换，过滤继续进行。图 5－17 表示了反洗的影响：过滤速度在反洗(虚线表示)后又恢复到较

高的程度。这种脉冲反洗对滤液输出的影响如图 5－18 所示，如果没有反洗，滤液体积将按虚线的趋势增长；在反洗作用下，滤液的输出量明显地得到提高。

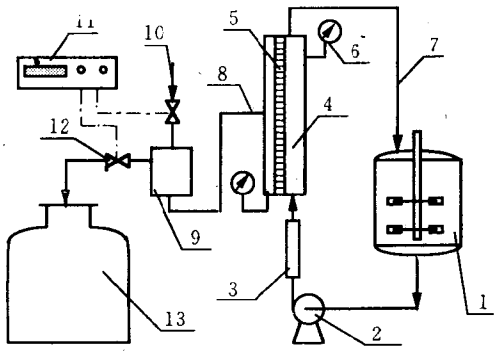


图 5－16　脉冲反洗式切向流过滤装置简图

1—发酵罐；　2—泵；　3—流量计；　4—切向流过滤器；　5—微孔膜；　6—压力计；　7—浓缩液；8—滤液；　9—反洗槽；　10—压缩空气；11—时间继电器；　12—电磁阀；　13—滤液收集器

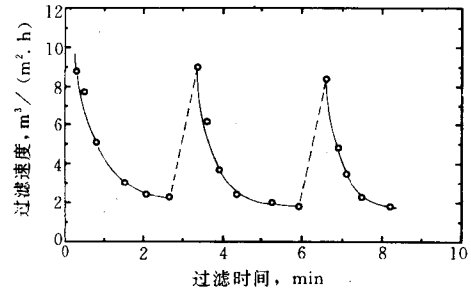


图 5－17　脉冲反洗对切向流过滤速度的影响

绿色木霉菌发酵液，19℃，细胞浓度 4.8kg/m³(干重)，切向流速度 0.12m/s，反洗频率：160s，切向流过滤～42s 反洗

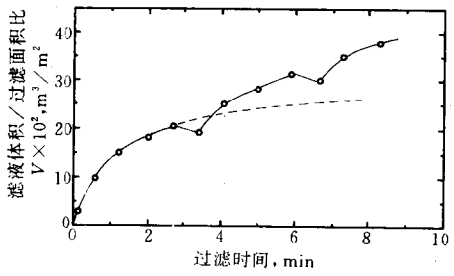


图 5－18　脉冲反洗对滤液产量的影响

实验条件同图 5－17

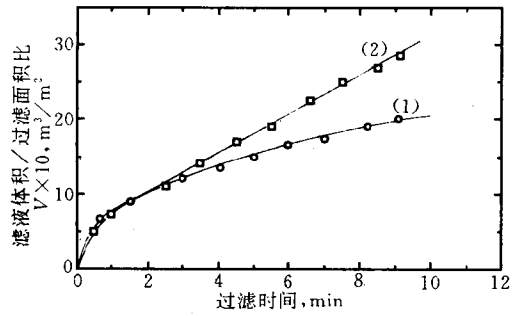


图 5－19　不同反洗频率对滤液产量的影响

绿色木霉菌发酵液，19℃，细胞浓度 11.2kg/m³(干重)，切向流速度 0.12m/s，

反洗频率：○—155s 切向流过滤～3s 反洗

(155s CFF＋3s RFC)；

□—52s 切向流过滤～3s 反洗

(52s CFF＋3s RFC)

反洗的频率和时间对过滤的平均速度影响很大。图 5－19 中两种不同的频率和时间导致不同的过滤速度，其中脉冲频率较高的反洗获得了较高的产量。由于不同的悬浮液的特性不同，有必要对反洗的频率进行优化。

（3） 生化悬浮液性质的调整 对所要分离的物料进行适当的预处理有可能使膜分离的速度大大加快。常用的方法有以下 3 种。

1） 调整 pH 值和离子强度。生物悬浮液中含有许多带电荷的大分子，易与膜发生吸附。通过调整 pH 值和离子强度改变易吸附的分子的电荷，可以减少堵塞污染。细胞及其碎片在某个 pH 值下也可能趋于絮凝成大颗粒，有利于过滤的进行，但要注意 pH 值和离子强度的改变有时会导致目标产物的失活。

2） 加入絮凝剂。虽然化学絮凝剂有很多种，但能应用到生化分离上的还十分有限，主要的原因是大部分絮凝剂有污染产物的可能。例如聚丙烯酰胺是无毒的，但合成它所用的单体丙烯酰胺却有毒。如果聚丙烯酰胺中混有单体，则有可能污染产物，造成事故。所以寻找合适的絮凝剂也是值得研究的课题。

英国学者曾用硼酸盐絮凝细胞碎片，实验达到中试规模。本章作者研究了用聚乙二醇絮凝酵母碎片，也取得了较好的结果。从安全性上讲，聚乙二醇要好一些。

3） 加入过滤助剂。硅藻土系列的过滤助剂已被大量用于啤酒的过滤。在分离细胞匀浆中的碎片时，加入适量的硅藻土可以显著地增加过滤速度。但使用硅藻土时要注意下列几个问题。

一是要注意目标产物是否会被硅藻土吸附。这种吸附常常与 pH 值有关。

二是要注意合适的添加量。添加过少不能起到有效的助滤；添加过多不仅是浪费，而且会增大固体含量，反而会使过滤速度下降。

三是要注意硅藻土的型号。对于细胞碎片要选择颗粒较细的硅藻土，过滤效果好。因为硅藻土过滤的机理是改善滤饼的结构，支撑出较多的孔道，但它的粒度必须与固体的尺寸相适应才有好的结合效果。

最后一点是硅藻土的排放。在美国等发达国家，用过的硅藻土的排放很受限制，所以他们尽量避免使用它。

第六节 双水相萃取[68～76]

生化固液分离中最困难的操作常常是从细胞破碎后的匀浆中移走细胞碎片。这些碎片尺寸分布很广（大部分为 0.2～1μm，0.2μm 以下的也很多），有细胞壁碎片、膜碎片，还有完整的细胞器、未破碎的细胞等。用离心机分离常常要在几万转下运行几十分钟以上，还不容易除掉某些絮状小碎片；用膜分离不仅速度慢，还易出现膜污染和蛋白质滞留。

萃取是化学工程中常用的单元操作，常用的组份是水相和有机相，利用被提取物在两相中的分配不同而实现分离的目的。但对于生物大分子（如蛋白质和酶），加入有机相会使其失活。自 80 年代开始，用双水相法萃取蛋白质受到重视。其操作是向水相中加入溶入水的高分子化合物，如 PEG（聚乙二醇）或葡聚糖，可以形成密度不同的两相（有时甚至是多相）：轻相富含某一种高分子化合物；重相富含盐类或另一种高分子化合物。因两相均含有较多的水，所以称之

为双水相。常用的双水相系统为 PEG/葡聚糖和 PEG/无机盐两种。由于葡聚糖价格较贵，所以 PEG/无机盐系统应用的更为广泛。

不同的蛋白质在双水相中的分配规律是不同的。文献上曾有很多研究试图用这一特性达到纯化某种蛋白质的目的，但与色谱分离相比，双水相萃取所能达到的纯度还相差较远。但是它在另一种分离过程——分离细胞碎片和胞内蛋白质中却显示了具有取代高速离心和膜分离的潜力。

双水相法分离细胞碎片和蛋白质的流程如图 5－20 所示。细胞悬浮液经过破碎机后，与 PEG 和无机盐在萃取器中混合，随后混合物通入离心机分相。上相(PEG 富集相)含有目标蛋白质(亦可能含有较多杂蛋白)，下相含有细胞碎片、核酸、多糖等。通过选择合适的萃取组成和条件，不仅可以除去近100%的细胞碎片，还可能使部分杂蛋白也分配在下相，从而达到部分纯化的目的。因此，双水相萃取法清除碎片比一般的离心和过滤法要优越。

但是选择合适的双水相组成却不是一件容易的事，需要通过大量的实验来确定。首先要解决在什么条件下能将细胞碎片只分配在一相中。图 5－21 表明了酵母细胞碎片在 PEG4000/硫酸铵双水相体系中的分配规律：当系统中只有 PEG、没有硫酸铵时，系统不形成双水相；当盐浓度增加到一定量后双水相形成。细胞碎片最初分配在下相，随着盐浓度的增加，碎片逐渐向上移动，先进入两相之间，最后完全进入上相。

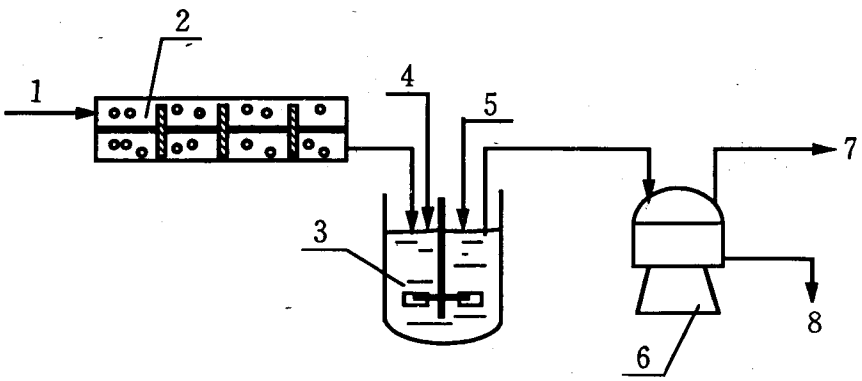


图 5－20　双水相分离细胞碎片和蛋白质的一般流程

1—细胞悬浮液；　2—细胞破碎机；　3—萃取器；　4—聚乙二醇；

5—无机盐；　6—离心机；　7—含目标产物的上清液；　8—含细胞碎片的下相

由上可见，通过合理调整双水相组成，可以把碎片分配在下相，也可以分配在上相。从实用的角度讲，碎片分配在下相的好处多，理由是：

1)　核酸等大部分杂质一般处于下相，可以同时除去；

2)　下相是无机盐富集相，作为废弃物扔掉，费用相应低一些；

3)　将蛋白质产物分配在上相有利于保持其活性(PEG 保护作用)，而下相的高盐浓度会造成产物失活或沉淀；

4)　碎片在下相有利于用连续式离心机分离，若在上相容易堵塞离心机出口。

实际上最困难的不是如何将碎片分配在下相，例如用 18%PEG1540 和 7%磷酸盐处理 20%的细胞匀浆液(E. coli，yeast 等)都可以使碎片分配在下相；最困难的是如何在保证碎片

分配在下相的同时，把蛋白质产物尽可能完全地分配在上相。

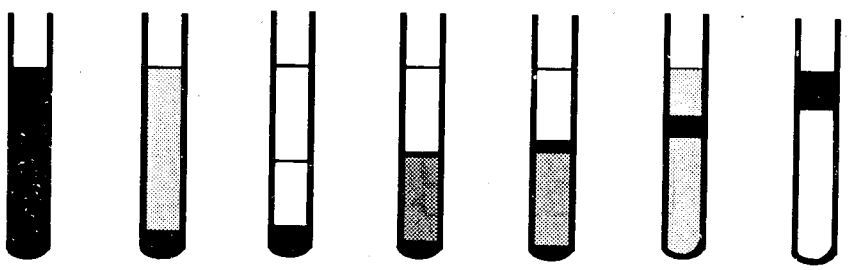
目标蛋白质在上相的收率(Y)可以用下式表示：

$$Y=\frac{RK}{RK+1}100\% \qquad (5—16)$$

其中 R 是上下相的液相体积之比，简称相比；K 是目标蛋白在上相中的分配系数，等于该蛋白的上相浓度和下相浓度之比。从(5—16)式看，要增大收率，必须增大 RK。为此要综合考虑以下几个因素的影响。

(1) PRG 浓度　增大 PEG 浓度会使相比 R 增加，上下相热力学特性的差异更大，不同物质的分配系数之间的差别也会增大，细胞的一些固体组份如细胞器和膜片会趋向于分配在两相之间的界面上。系统的粘度也会增大。

(2) PEG 的分子量　增大 PEG 的分子量一般会降低蛋白质的分配系数，同时会使细胞碎片更趋向于分配在下相。增加 PEG 分子量对于不同蛋白质的作用不同。对于分子量大的蛋白质，PEG 分子量的增加对其分配系数的影响比对分子量小的蛋白质的影响更大。增大 PEG 的分子量对细胞碎片的影响也比对蛋白质大。因此可以通过增大 PEG 分子量的方法来分离碎片和蛋白质，以及分离不同分子量的蛋白质。



$(NH_4)_2SO_4$，%	0	5	8	10	12	15	16
PEG4000，%	10	10	10	10	10	10	10

图 5－21　细胞碎片在双水相中的分配规律

5%酿酒酵母匀浆(水平搅拌式珠磨机破碎)

(3) 盐和 pH 值　盐浓度的提高会使下相体积增大，减小上下相的相比，同时会使细胞碎片有向上相分布的趋势。盐的种类对蛋白质的分配系数有显著影响。对于带负电荷的蛋白质，其分配系数因阳离子的存在而按下列顺序降低：$Li^+<NH_4^+<Na^+<Cs^+<K^+$；阴离子按下列顺序降低其分配系数：$F^-<Cl^-<Br^-<I^-$。而二价阴离子 HPO_4^{2-}、SO_4^{2-} 和二价柠檬酸根离子会增大其分配系数。对于带正电荷的蛋白质，其情况正好与上面相反。因此，要使带负电荷的蛋白质的分配系数增加，应使用 Li^+ 和 HPO_4^{2-}，或 SO_4^{2-} 等。

双水相萃取技术目前还不很成熟，虽然已进行了一些研究工作，但还未见到有工业应用的报道。

双水相萃取与细胞破碎的结合　作者在研究双水相清除细胞碎片的过程中，发展了一种将细胞破碎与双水相萃取相结合的技术，以高速珠磨机为设备，将细胞破碎和双水相萃取同时在珠磨机内进行。整个操作如图 5－22 所示。在细胞悬浮液中加入 PEG 和无机盐后通入高速珠磨机进行破碎。由于珠磨机内有良好的混合条件，PEG、无机盐和水得到充分混合，形成均匀

的双水相分散体系。细胞破碎释放出的产物很快被萃取到PEG富集相。经过珠磨机加工的匀浆直接用离心机分相，细胞碎片分配在下相，胞内产物分配在上相。这种方法不仅节省了萃取设备和时间，而且由于双水相对很多蛋白质具有保持活性的特点，可以避免胞内产物的损失。

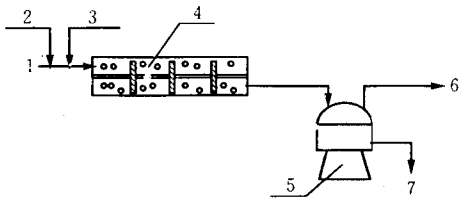


图 5－22　细胞破碎和双水相萃取同时进行

1—细胞悬浮液；　2—聚乙二醇；　3—无机盐萃取器；　4—细胞破碎机

5—离心机；　6—含目标产物的上清液；　7—含细胞碎片的下相

第七节　避开固液分离的探索[77~83]

生物工程下游加工中的固液分离是麻烦较多的操作。自下游加工技术受到重视以来，避免固液分离操作、而从悬浮液中直接吸附产物一直是研究者们探索的方向。

直接吸附产物的好处在于：

（1）　直接吸附有可能回收液相中的全部产物，而固液分离常常不可避免地损失一部分液体，难以回收其中的产物，而且有时固体还可能吸附走一部分产物；

（2）　直接吸附缩短了加工时间，减少了产物受污染和降解的机会，有可能提高产量；

（3）　直接吸附可以同时除去大量的液相杂质，使产物很快得到纯化。

尽管直接吸附有上述好处，但遇到的问题也不少，因为目前还在研究之中。

一、流化床直接吸附法

将悬浮液从装有固体吸附剂的吸附柱下口通入，在柱内作自下而上的流动。在一定流速下，吸附剂床层松动，出现流态化，颗粒之间的距离加大，允许悬浮液中的固体通过，液相中的产物被吸附。待吸附结束后，再以流态化的方式清洗掉滞留在床层中的固体。最后可以在上面加入洗脱剂以固定床的方式进行洗脱。

此法的难点在于选择合适的吸附剂。琼脂糖凝胶的密度小，显然不适合这种应用；硅胶密度大一些，但很难制出大小完全一致的颗粒，因此很难控制流态化。

二、膜直接吸附法

微孔膜是固液分离的介质。在微孔膜过滤生物悬浮液时，固体颗粒被滞留在膜的一面，可溶性大分子（如蛋白质、核酸、多糖等）能够透过膜上的微孔，成为滤液的组份。如果将膜进行处理，使之带有离子交换和亲和配基等吸附基团，那么当产物分子经过膜的孔道时，就会被那里的配基吸附住，滤液中就没有该产物。经过洗膜之后，加入特异性洗脱剂，就可以将膜上吸附的产物洗脱下来。这样一步膜分离的效果相当于过滤、浓缩和吸附三个操作，简化了工艺，提高了分离速度。这种具有吸附功能的膜目前还处于研究之中，将它用于直接吸附蛋白质产物还有膜的污染堵塞，配基容量低等问题。

参考文献

1 Y. Chisti and M. Moo－Young. Enzyme Microb. Technol.. 1986, 8(4): 194～204

2 S. T. L. Harrion. Biotechnol. Adv.. 1991, 9(2): 217～240

3 李祖义等,生物工程学报. 1991, 7(2): 192～194

4 Yoshiyuki Omori, et al.. J. of Fermentation and Bioengineering. 1989, 67(1): 52～56

5 A. Bomberg, et al.. Biotechnol. Techniques. 1988, 2(2): 105～108

6 E. Keshavarz, et al.. Enzyme Microb. Technol.. 1990, 12(10): 764～770

7 P. J. Hetherington, et al.. Transaction of the Institution of Chemical Engineers. 1971, 49: 142～148

8 T. Sauer, et al.. Biotechnol. Bioeng. 1989, 33(10): 1330～1342

9 C. R. Engler and C. W. Robinson. Biotechnol. Bioeng. 1981, 23: 765～780

10 J. A. Asenjo. Downstream Processing in Biotechnology. New York: Marcel Dekker, Inc. 1990, 67～209.

11 E. Keshavarz, et al.. Enzyme Microb. Technol.. 1990, 12(7): 494～498.

12 A. P. J. Middelberg, et al.. Biotechnol. Bioeng. 1991, 38: 363～370

13 G. Hedenskog, et al.. Biotechnol. Bioeng.. 1970, 12: 947～959

14 J. A. Currie, et al.. Biotechnol. Bioeng.. 1972, 16: 725～736

15 F. Marffy and M. －R. Kula. Biotechnol. Bioeng. 1974, 16: 623～634

16 D. Deters, et al.. Analytical Biochemistry. 1976, 70: 263～267

17 J. Rehacek and J. Schaefer. Biotechnol. Bioeng. 1977, 19(10): 1523～1530

18 J. R. Woodrow and A. V. Quirk. Enzyme Microb. Technol.. 1982, 4(11): 385～389

19 H. Schuette, et al.. Enzyme Microb. Technol.. 1983, 5(2): 143～148

20 H. Schutte and M. ～R. Kula. Biotechnology and Applied Biochemistry 1990, 12: 599～620

21 H. Mogren, et al.. Biotechnol. Bioeng. 1974, 16: 261～274

22 J. Limon－Lason, et al.. Biotechnol. Bioeng.. 1979, 21: 745～774

23 C. －H. Lee, et al.. Biotechnol. Bioeng.. 1979, 21: 1～17

24 F. G. Mosqueira, et al.. Biotechnol. Bioeng.. 1981, 23: 335～343

25 J. Kloostermaniv, et al.. The Chemical Engineering Journal. 1988, 37: B47～54

26 I. Agercvist and S.－O. Enfors. Biotechnol. Bioeng.. 1990, 36: 1083～1089

27 D. A. J. Wase and Y. R. Patel. J. Chem. Tech. Biotechnol.. 1985, 35B:165～173

28 M. S. Daulah. Biotechnol. Bioeng.. 1977, 19: 649～660

29 H. Felix. Analytical Biochemistry. 1982, 120: 211～34

30 D. J. Hettwer and H. Y. Wang. Biotechnol. Bioeng.. 1989, 33: 886～895

31 T. J. Naglak and H. Y. Wang. Enzyme Microb. Technol.. 1990, 12(8): 603～

32 R. H. Cumming, et al.. Proceeding of Biotec USA. 1985, 2: A7～14

33 J. S. Watson, et al.. Proceeding of 11th Annual Research Meeting of the Institution of Chemical Engineers, Bath, April 1984: 191～195.

34 江慧修. 微生物学报. 1989, 29(1): 33～38

35 J. A. Asenjo and P. Dunnill. Biotechnol. Bioeng.. 1981, 23: 1045～56

36 E. Zomer, et al.. Enzyme Microb. Technol. 1987, 9(5): 281～284

37 J. B. Hunter and J. A. Asenjo. Biotechnol. Bioeng.. 1988, 31: 929～943

38 C. Baldwin and C. W. Robinson. Biotechnol. Techniques. 1990, 4(5): 329 ～334

39 C. L. Cooney, et al.. Biotechnol. Lett. 1989, 11(12): 845 ～850

40 J. J. Higgins, et al.. Biotechnol. Bioeng. 1987, 20: 159～182

41 Z. －G. Su, et al.. Proc. 4th European Congress on Biotechnology. 1987, 2: 554～557

42 苏志国. 生物工程学报. 1990, 6(3): 240～245

43 D. T. Moir and J. -I. Mao. In: Downstream Processing in Biotechnology (J. A. Asenjo (ed)). New York: Marcel Dekker, Inc. 1990, 67～94.

44 J. Bonnerjea, et al.. Enzyme Microb. Technol., 1988, 10(6): 357～60

45 J. A. Shaeiwitz, et al.. Biotechnol. Bioeng., 1989, 34(1): 137～140

46 J. F. Kane and D. Hartley. TIBTECH. 1988, 6: 95～101

47 A. Mitraki and J. King. Bio/technol. 1989, 7: 690～697

48 D. V. Sakharov, et al.. Biochemical Engineeting for 2001. Tokyo: Springer-Verlag, 1992, 59～61

49 A. J. Hagen et al.. Biotechnol. Bioeng.. 1990, 35: 955～965

50 S. M. Forman, et al.. J. Memb. Sci. 1990, 48: 263～279

51 D. N. Brems. Biochemistry. 1998, 27: 4541～4546

52 O. B. Ptitsyn et al.. FEBS Letters. 1990, 262: 20～24

53 U. Wiesmann and H. Binder. Adv. in Biochem. Eng. and Biotechnol. 1982, 24: 119～171

54 K. H. Brunner. Chemie Technik. 1983, 4: 39～45

55 C. -G. Rosen. Biotech 84. 1984, 317～333

56 K. Cliffe. Biotechnology for Engineers. Chichester: Ellis Horwood. 1988, 302～321

57 P. A. Belter, et al.. Bioseparation. New York: John Wiley &Sons, 1988

58 M. S. Le et al.. J. Memb. Sci.. 1984, 21: 219～232

59 H. Strathmann. Trends in Biotechnol.. 1985, 3: 112～118

60 F. R. Gabler. in: Comprehensive Biotechnology. Vol. 2. (C. L. Cooney and A. E. Humphrey (eds)). Oxford: Pergamon Press, 1985, 351 ～366.

61 J. D. Henry. in: Recent Developments in Separation Science (Vol. 2, N. N. Li (ed)). Boca Raton: CRC Press, 1972, 205～225.

62 W. Tobler. Filtr. & Separ.. 1982, 19: 329～332

63 J. Zahka and T. J. Leahy. ACS Symposium Ser.. 1985, 271: 51～69

64 K. H. Kroner et al.. Process Biochem. 1984, 19(2): 67～74

65 A. G. Fane and J. M. Radovcvh. in: Separation Processes in biotechnology (J. A. Asenjo (ed)). New York: Marcel Dekker, 1990, 209～262.

66 R. Datar. Filtr. & Separ.. 1984, 21: 402～406

67 Z. -G. Su and D. E. Brown. J. Chem. Ind. & Eng. 1990, 5(2): 143～152

68 H. Hustedt, et al.. in: Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems (H. Walter, et al. (eds)). Orlando: Academic Press, 1985, 529～587.

69 Kroner, K. H. et al.. J. Chem. Tech. Biotechnol.. 1982, 32: 130～137

70 A. Veide, et al.. Biotechnol. Bioeng.. 1983, 25: 1789～1800

71 R. Datar and C.-G. Rosen. J. Biotechnol.. 1986, 3: 207～219

72 M. -R. Kula, et al.. Adv. in Biochem Eng. and Biotechnol. 1982, 24: 73～118

73 P. -A. Albersson et al.. Biochem. Biophys. Acta. 1987, 926: 87～93

74 G. Johansson et al.. J. Chromatogr.. 1984, 298: 483～493

75 K. H. Kroner et al.. in: Affinity chromatography and related techniques (T. C. J. Gribnau et al. (eds)). Amsterdam: Elsevier, 1982, 491～501.

76 F. Tjerneld et al.. Enzyme Microb. Technol.. 1986, 8: 417～423

77 A. P. Mathew and L. T. Fan. AIChE Symp. Ser.. 1983, 79(23): 79

78 F. J. Dechow. Separation and Purification techniques in biotechnology. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, 1989, 117～124.

79 V. K. Garg. In: Frontiers in Bioprocessing Ⅱ (P. Todd, S. K. Sikdar and M. Bier (Eds)). Washington DC: ACS, 1992, 321.

80 Champluvier and M. −R. Kula, In Separations for Biotechnology 2 (D. L. Pyle (ed). London: Elsevier Applied Sciencce, 1992, 295.

81 K. G. Brief and M. −R. Kula. Chem. Eng. Sci.. 1992, 47: 141

82 S. Brandt, et al. : Membrane−based technology for commercial scale pruifications, Biotechnol. 1988 6: 779～782

83 Z. −G. Su et al.. in: Biochemical Engineering for 2001 (S. Furusaki, et al. (eds)). Tokyo: Springer−Verlag, 1992, 533～536.

第六章　膜分离技术在生物工程中的应用

刘忠洲

（中国科学院生态环境研究中心，北京，100085）

第一节　概　述

膜分离技术是用半透膜作为选择障碍层，允许某些组份透过而保留混合物中其它组份，从而达到分离目的的技术。它具有设备简单、操作方便、无相变、无化学变化、处理效率高和省能等优点，已作为一种单元操作日益受到人们极大重视。在其发展过程中，1960 年 Loeb 和 Sourirajan 制备出第一张具有高透水性和高脱盐率的不对称反渗透膜是膜分离技术发展的一个里程碑，使反渗透技术大规模用于水脱盐成为现实。自那以后，不仅在膜材料范围上有了极大扩展，而且在制膜技术、组件结构及设备研制方面也取得了重大进展。这些进展又大大促进了微滤和超滤技术发展，使整个膜分离技术迅速向工业化应用迈进。目前，膜分离技术已在电子工业、食品工业、医药工业、环境保护和生物工程等领域中得到广泛的应用。

在生物工程中，发酵液是含有生物体、可溶性大分子和电解质等的复杂混合物，其主要组成及其尺寸大小列于表 6－1[2]。

表 6－1　发酵液中可能存在的主要成份

组　份	分子量，道尔顿	尺寸大小，μm
酵母和真菌		10^3～10^4
细　菌		300～10^4
胶　体		100～10^3
病　毒		30～300
蛋白质	10^4～10^6	2～10
多　糖	10^4～10^6	2～10
酶	10^4～10^6	2～10
抗　体	300～10^3	0.6～1.2
单　糖	200～400	0.8～1.0
有机酸	100～500	0.4～0.8
无机离子	10～100	0.2～0.4

显然，从发酵液中分离提取出纯的有用成份（如酶、多糖或其它蛋白质等），必须采用多种

分离手段。图 6－1 是按分离的粒子或分子大小分类的各种分离过程[1]。由图可知，5 种主要的膜分离过程覆盖了一个相当宽的粒子大小范围。通常沉淀 、过滤、离心、超离心用于发酵液菌体分离，前二者存在澄清不彻底、劳动量大、时间冗长等缺点；后二者又有投资运行费用高、操作与维修困难等问题。在分离浓缩步骤中，可用离子交换、蒸发、色谱等手段，但又碰到处理量大、有些物质对热与化学环境敏感等问题。膜分离技术由于具有如下优点而使其能在生物产品分离、提取与纯化过程中发挥作用。

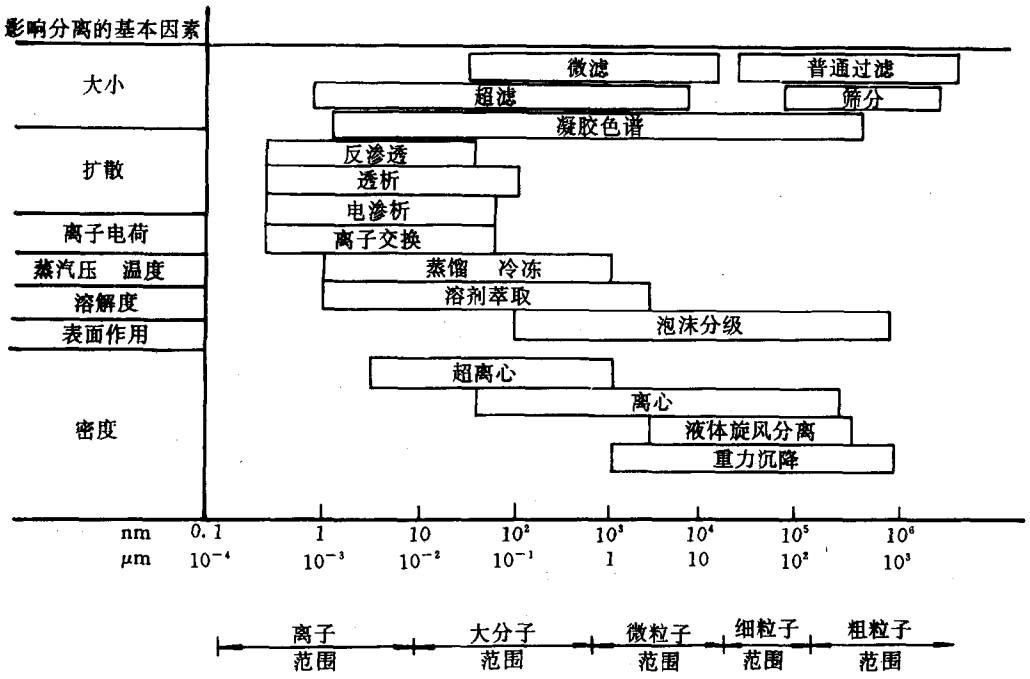


图 6－1 各种分离方法分离的粒子大小范围

(1) 处理效率高，设备易于放大。

(2) 可在室温或低温下操作，适宜于热敏感物质的分离浓缩。

(3) 化学强度与机械损害最小，减少失活。

(4) 无相转变，省能。

(5) 有相当好的选择性，可在分离、浓缩的同时达到部分纯化之目的。

(6) 选择合适的膜与操作参数，可得到较高回收率。

(7) 系统可密闭循环，防止外来污染。

(8) 不外加化学物，透过液(酸、碱或盐溶液)可循环使用，降低了成本，并减少对环境的污染。

第二节 几种膜分离过程的定义与分离原理

用于生物工程处理的主要几种膜过程特性列于表 6－2，它们的驱动力、分离粒子范围和应用对象有所不同。反渗透、超滤和微滤3个压力驱动膜过程可分离的粒子大小示例于图

6－2。

表 6－2　用于生物工程后处理的几种主要膜过程[4]

过程	膜	驱动力	应用对象	示　例
微　滤	对称微孔膜 (0.05～10μm)	压　力 0.1～0.5MPa	消毒、澄清、细胞收集	培养基液除菌体，产品消毒，细胞收集
超　滤	不对称微孔膜 (1～20nm)	压　力 0.2～1MPa	大分子物质分离	酶及蛋白质的分离、浓缩，超滤亲和纯化，血浆分离，膜反应器，脱盐，去热源
反渗透	带皮层的 不对称膜	压　力 1～10MPa	小分子溶质浓缩	低浓度乙醇浓缩，糖及氨基酸的浓缩等
透　析	对称的或 不对称膜	浓度梯度	小分子有机物 和无机物离子	脱除小分子有机物或无机物离子
电渗析	离子交换膜	电位差	离子和蛋白分离	脱盐，氨基酸分离等

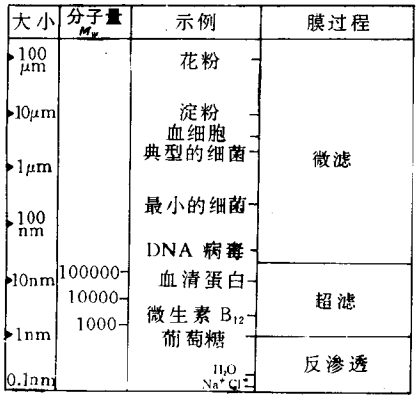


图 6－2　微滤、超滤、反渗透分离组分示例

1. 微滤

利用筛分原理，分离、截留直径为 0.02μm 到 10μm 大小的粒子的膜分离技术，即微滤膜的孔径为 0.02μm 到 10μm(图 6－3)。

2. 超滤

超滤的分离原理也可基本理解为筛分原理，但有些情况下受到粒子荷电性与荷电膜相互作用影响。它可分离分子量从 300 到 1 000 000 道尔顿的可溶性大分子物质，对应孔径为 1～20nm(0.001μm 到 0.02μm)(图 6－3、图 6－4)。

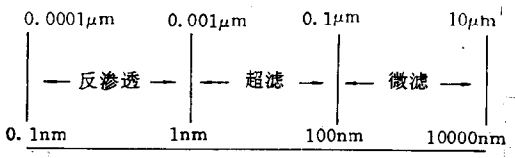


图 6－3　基于分离粒子大小的 3 个压力驱动膜过程的定义

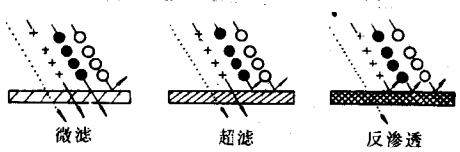


图 6－4　几种压力驱动膜分离过程示意图
○：微粒子；●：大分子；＋：小分子；……：水

3. 反渗透

在高于溶液渗透压的压力作用下，只有溶液中的水透过膜，而所有的溶液中的大分子、小分子有机物及无机盐全被截留住。理想的反渗透膜应被认为是无孔的，它分离的基本原理是溶解扩散（也有毛细孔流学说）。“膜孔径”为 0.1～1nm（图 6－3、图 6－4）。

4. 透析

它基于分子大小、分子构象与电荷，以浓度梯度为驱动力，通过水与小分子物质扩散达到分离浓缩的目的。透析膜具有反渗透膜无孔和超滤膜极细孔特性，根据所用膜孔径不同，可分离浓缩大分子而去除中等分子、小分子有机物及无机盐。缺点是速度慢，处理量小。

5. 电渗析

它是通过在电位差下用荷电膜从水溶液中分离离子的过程，其原理如图 6－5。阴、阳离子交换膜被交替排列在正、负极之间形成许多独立的小单元。当含离子溶液在电场下通过这些单元时，有些单元里的正、负离子可透过正、负离子交换膜进入另一些单元而变成脱盐水，另一些单元中正、负离子因电场作用和膜电荷排斥作用而留在单元里，加上过来的离子生成浓盐水。

还有一些其它可在生物工程中发挥作用的膜分离技术，请参阅参考文献〔3〕。

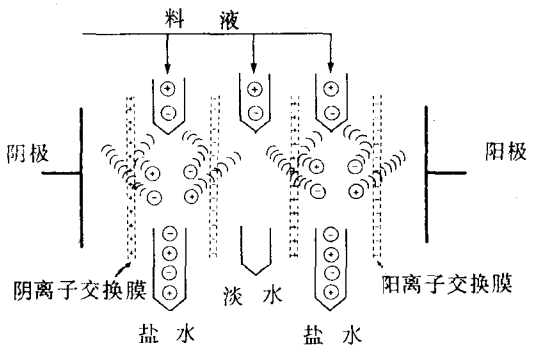


图 6－5　电渗析原理示意图

第三节　膜结构及其分离特性

一、微滤膜

按孔结构来分类，微滤膜可分为毛细孔膜（左）和弯曲孔膜（右）两类（图 6－6）[3]，它们是因制备方法不同而形成的。弯曲孔膜又可分为 A、B 两种：A 用拉伸方法制备，B 为相转换方法生产。由图可知，毛细孔膜孔径分布均匀，但孔隙率（更确切地说是孔密度）较低，透水量较小；而弯曲孔膜孔隙率高，但孔径分布很宽，因而透水率较毛细孔膜高得多。值得指出的是这两种膜在过滤特性上有很大区别。表 6－3 列出了纤维素膜（弯曲孔膜）和核孔膜（毛细孔膜）过滤金胶体粒子截留情况。结果表明，虽然弯曲孔膜孔径比胶粒直径大得多，但仍显示很高的截留能力；而毛细孔膜则截留率很低，这是由于弯曲孔膜具有大得多的厚度和可吸附的内表面所致。因此在分离粒子时，用毛细孔膜最好，而在以除去粒子为目的的应用中，选择弯曲孔膜最为合适。另外，毛细孔膜过滤时，粒子积聚在膜表面（属表面筛滤），所以可用反冲有效地洗去沉积物，恢复透水率。而弯曲孔膜过滤，粒子被吸附或截留在膜的深层（具有深层过滤作用），难以用冲洗方法洗出，因此膜一旦被污染，透水率回复率很低。近年来，在发展不对称微滤膜方面取得了重大进展，它可基本消除内孔污染，因而透水量衰减慢，具有广泛应用前景。

表 6－3　纤维素膜和核孔膜过滤金溶胶粒子结果比较

	截留率，%	胶体粒径，μm
膜	0.05	0.005
0.1 μm 核孔膜	1.2	0.2
0.1 μm 纤维素膜	92.0	8.2
0.4 μm 核孔膜	1.3	0.2
0.45 μm 纤维素膜	46.9	12.7
1.0 μm 核孔膜	0.7	0.3
1.2 μm 纤维素膜	46.5	26.7
3.0 μm 核孔膜	0.4	0.2
5.0 μm 纤维素膜	59.3	17.9

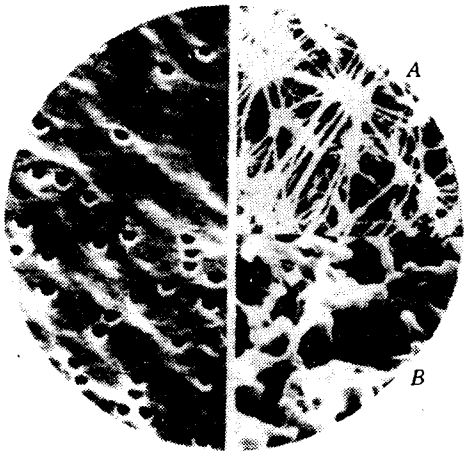


图 6－6　毛细孔与弯曲孔微滤膜结构照片

微滤膜按材料可分为合成聚合物微滤膜和无机微滤膜。国外生产孔径 0.1～12μm 微滤膜的一些厂家列于表 6－4。

表 6－4　各种微滤膜的性质

聚合物	膜　类　型	孔径，μm	透水率①	备　注
醋酸纤维素酯	Gelman；GA metricel	0.2	300	高温消毒
		5.0	4000	
混合纤维素酯	Domnick Hunter ASYPOR	0.2	300	不对称
	Millipore VS	0.025	20	高温消毒
	Millipore SC	8.0	10000	
再生纤维素	Sartorius RC	0.2	300	蒸汽消毒
		0.8	3000	
聚　砜	Gelman HT－Tuffryn	0.1	60	蒸汽消毒
		0.65	1200	
丙烯腈聚合物	Gelman Versapor	0.2	300	支　撑
		10	20000	亲　水

（续表）

聚合物	膜 类 型	孔径，μm	透水率①	备 注
聚氯乙烯	Millipore BO	0.6	500	可卷曲，高温消毒
	Millipore BS	2.0	3500	不可消毒
聚碳酸酯	Nuclepore	0.05	3	
		0.2	250	
		12	20000	
尼 龙	Pall Ultipore	0.1		亲 水
		0.45		
聚 丙 烯	Membrana Accurel	0.2	20～200	
	Membrana Accurel	0.4		
	New Brunswick	0.1	20～200	
聚偏氟乙烯	Millipore GVHP	0.22	250	
	Millipore GVWP	0.22	250	
	Millipore HVHP	0.45	500	
Teflon②	Dorr Oliver CF2M	0.2		最高温度 75℃
	Dorr Oliver CF30M	3.0		疏水
PTFE③	Gelman TF	0.2	500	蒸汽消毒
	Gelman TF	1.0	1200	支撑、疏水
Al_2O_3	Ceraflo	0.2	75	蒸汽消毒，亲水
	Ceraflo	1.0		
	Ceraver	0.2		
	Ceraver	5.0		
不锈钢	Pall PMM	2		不锈钢纤维粉末
	Pall POS	5		烧结

①透水率：$m^3/(m^2 \cdot d)$； ②Teflon 为含氟聚合物； ③PTFE 为聚四氟乙烯。

二、超滤膜与反渗透膜

与反渗透膜和微滤膜一样，按材料分超滤膜有合成聚合物膜和无机膜两类，结构上均是不对称结构，有指状孔结构与海绵状结构，而且近年来开发出复合膜品种，它们的横截面结构示于图 6－7。通常用透水率和脱盐率来表明反渗透膜性能，测定的方法较简单，不同公司的膜性能可以相互比较；但作为超滤膜的性能——透水率与截留分子量，前者尚可相对比较，后者则极为困难。有时从标称截留分子量看一样，然而实际应用中差别很大。这里介绍一下截留分子量的确定过程，有助于对其定义的理解和在实际应用中对这一指标的选择。

在成膜过程中超滤膜表面形成的孔大小不一样，存在一个孔径分布（图 6－8）。因此不能用某一种分子量的球形蛋白质或水溶性聚合物来确定其截留分子量，而是要用几种不同分子量蛋白质或水溶性聚合物测出一条切割分子量曲线（图 6－9），然后选择截留率在 90％的那点对应的分子量作为该膜截留分子量[17]。也有厂家把截留率定为 95％时的分子量作为截留分子量。

另外由于膜的截留分子量受测定条件（如压力、温度、搅拌速度、溶质浓度、缓冲液系统、溶液体积对膜面积之比、透过液体积对原液体积之比等）的影响，目前在世界上尚无统一标准，而且各个厂家所用标准蛋白质或水溶性聚合物也不一样，所以很难把不同来源膜的截留分子量作统一比较。作者的工作还发现，即使用的蛋白质是同一厂家的，还会因批次不同而导致测定

结果不同。作者认为，对于超滤膜的截留分子量的认识必须注意以下 3 点。。

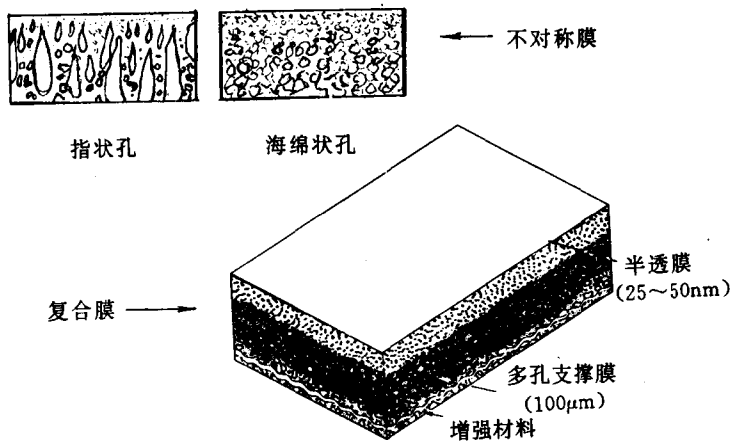


图 6－7　不对称膜与复合膜横截面结构示意图

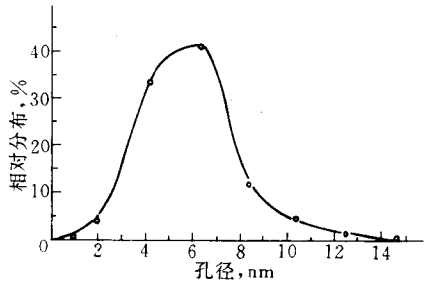


图 6－8　Millipore 公司 PTGC 超滤膜孔径分布

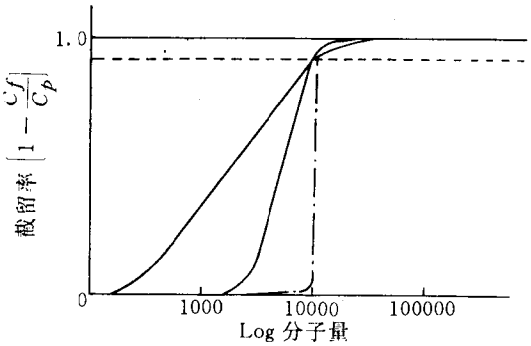


图 6－9　膜的截留分子量曲线图

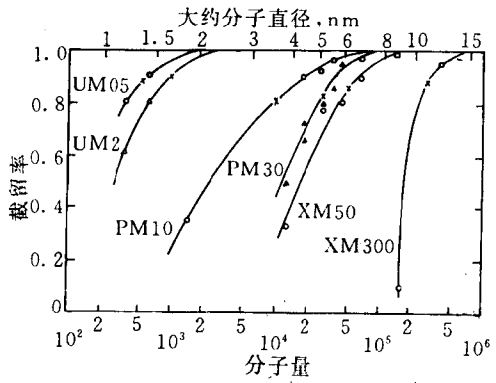


图 6－10　Amicon 超滤膜截留分子量曲线图
×——膜的标称截留分子量

(1) 不要认为用超滤膜分离浓缩蛋白质和其它大分子时，低于截留分子量的分子全可透过膜，而大于截留分子量的分子全被截住。实际上，不同厂家的膜切割分子量敏锐性不同，越接近理想切割分离曲线越好(图 6－9、图 6－10)。

(2) 被分离浓缩物的分子特性〔如大小、形状、构象、化学特性(电荷)等〕对膜截留分子量的选择极为重要。一般而言，在溶液中呈线性分子的截留率较低，而支化聚合物较高，球形蛋白最高。表 6－5 列出溶质特性对它们被截留的特性的影响。

表 6－5 结果表明：在分子量相同时，截留率顺序为球蛋白＞支链聚合物＞线性聚合物。也就是说，在分离浓缩多糖或线性大分子时，要用截留分子量低于被分离物分子量的膜。另外，要注意厂家标称截留分子量是用什么作标准物测定的。目前国内各研究单位和厂家，对截留分子量＞10000 道尔顿的膜，用球形蛋白质测定，截留分子量＜10000 道尔顿的膜多用聚乙二醇或多糖测定。

表 6－5 溶质特性对膜截留特性的影响①

膜商品号	球 蛋 白	支链聚合物	线性聚合物
	γ－球蛋白 (160000)②		
	血清白蛋白 (69000)		
XM50			
	胃蛋白酶 (35000)	葡聚糖 250 (236000)	
PM30			
	细胞色素 C (13000)	葡聚糖 110 (100000)	聚丙烯酸(50000)
	胰岛素 (5700)		
PM10			
	杆菌酞 (1400)	葡聚糖 40 (40000)	聚乙二醇(20000)
		葡聚糖 10 (10000)	
UM10			

①括号内指分子量； ②在膜对应横线以上的分子被膜截留。

(3) 截留分子量通常是用单一蛋白质或大分子溶液进行，而实际分离浓缩酶或其它蛋白质时，溶液是一个不同分子量蛋白质和/或可溶性大分子(如多糖)的复杂混合物体系。因此这时膜的分离特性会因浓差极化或“凝胶层”形成而有所改变(图 6－11)，一般是较小分子量的溶质截留率比单一溶质时增大。

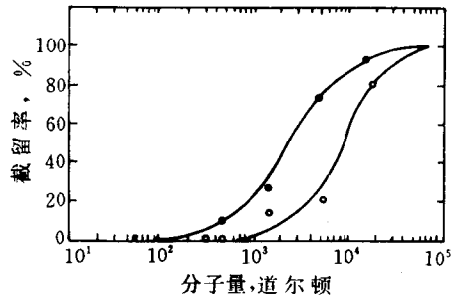


图 6－11 超滤膜分离单一溶质与加有蛋白质时溶质的截留特性的变化
○——单一溶质；●——加有血清蛋白溶质

由上所述可知，标称截留分子量仅可作为使用者的参考，何种规格的膜适用必须用实验来确定。这部分工作最好在实验室以杯型超滤器、平板膜片进行，花费较小。

三、电渗析膜

电渗析膜是一种致密离子交换膜。阳离子交换膜是指在聚合物骨架上带有负离子基团，通常是强酸性基团(—SO_3H)。阴离子交换膜是指在聚合物骨架上带有正离子基团，通常是强碱性基团(—NR_4^+)。

第四节　生物工程后处理过程中膜分离技术的选择与应用

在生物工程后处理中，膜分离技术常被用于分离、浓缩、分级与纯化生物产品[4~6]。根据不同目标产品，用的膜分离技术组合也有所不同。

一、微生物的分离与收集

发酵液的第一步分离一般是去除悬浮的微生物、粒子与胶体。表 6－6 列出某些典型生物工程发酵液中固体物的浓度。表 6－7 说明某些发酵液的特性。

表 6－6　典型发酵液组份含量

产　　物	干重量浓度，%
细菌或酵母	3～5
真菌(柠檬酸、青霉素生产)	1.5～3
动物细胞(哺乳动物组织培养)	0.05～0.2
植物组织培养	0.1～5
柠檬酸	10
乳　酸	5
胞外酶	0.5～1.0
微生素	0.005～0.1
抗　体	1～5
乙　醇	7～12

表 6－7　一些发酵液的特性

类　型	大小，μm	2%(w/w)悬浮液粘度，mPa.s	抗剪切力性能
细胞残核	0.4×0.4	1.5	
细　菌	1×2	1.5	好
酵　母	2×10	1.5	好
哺乳动物细胞	40×40	3	弱
植物细胞	100×100	3	弱
真　菌	1.10×一簇	8000	相当好

目前较好的细胞收集方法是过滤或离心，从经济性考虑，工业规模的方法应是连续过程，但连续离心设备昂贵，操作和维修费用高，而且生产速度受粒径、粒子与悬浮液密度差、液体粘度及离心力大小的控制，还需冷却系统降温等。表 6－8 给出实验室小规模收集微生物细胞费用比较。转鼓真空过滤也是连续分离微生物的一个方法，其主要问题在于固体颗粒物聚集而使

滤速急骤下降，若采用助滤剂则增加了费用。

近年发展起来的错流过滤受到人们注视，其实质与超滤操作相似，它具有如下优点。

（1） 对大小不同的细胞可较灵活地选用孔径不同的膜。

（2） 透水量不依赖于细胞与悬浮介质间的密度差。

（3） 不需要任何助剂，有利于下一步纯化。

（4） 选择合适膜可使细胞在膜表面的沉积减少到最小，所以有长时间的高透水量。

（5） 与离心相比可减少空气中病原体的污染。

（6） 回收率高。

（7） 可通过增加膜面积来扩大处理能力。可以预期，随着分离膜的发展，错流过滤收集细胞或超滤收集细胞将会替代离心和转鼓真空过滤。

表 6－8 超滤与连续离心法小规模收集微生物费用比较

	细 菌		酵 母	
	超滤①	离 心	超滤①	离 心
初始浓度	4×10^9 个/ml(0.7 Vol%)		1×10^7 个/ml	
浓缩倍数	10	10	100	500
细胞回收率，%	98	<70	98	90
生产速率，L/h	30	6	40	30
系统费用，美元	9000	8000	6000	20000

①用 Amicon 中空纤维组件。"Vol%"为体积百分数。

在采用错流过滤或超滤收集细胞时，要考虑下列因素。

（1） 膜孔径的选择 从理论上讲，用微滤膜进行微生物收集完全合适，选择 0.2μm 或稍大点孔的膜可提高适水量。但实际实验发现，采用较大孔径膜时，因有更高污染速率而使长时间透水量下降，从图 6－12 可直观看出粒径、孔径和操作参数间的关系。在操作参数相同的情况下，当被分离粒子大小和膜孔径在同一数量级时，培养液中混杂的更小微生物可能堵孔而使流量迅速下降；若选择的膜孔径比被分离粒子小得较多时，混杂的小微生物（如图 6－12 所示）不会停止在孔上而堵孔，将被流体剪切力带走，因而有较高（较长时间运转后）透水量。这种孔径与长时间透水量相反作用的情况已被许多研究者发现。Merin 等人[8]的实践结果表明，奶制品处理中，较大孔的微滤膜起始透水量较高，但几分钟后迅速降低，它的长时间稳定透水量比较小孔微孔膜还低（图 6－13）。Rogers 等[10]在收集 Z. Mobilis 细胞时也得到同样结果。Patel[11]在用管状微滤膜收集酵母时也观察到相似现象。Radlette 在浓缩哺乳动物细胞时发现 3.0μm 微孔膜比 0.6μm 和 0.2μm 膜污染快得多，0.6μm 膜显示最大透水量。Le 等[10]在收集 Ervinia Ccarotovoca 细胞时，发现 0.45μm 膜透水率几乎是 0.6μm 膜的 2 倍，而 0.2μm 膜透水率仅是 0.6μm 膜的 1/5。Porter 等[14]甚至在用超滤和微滤膜去除发酵液中菌体时，XM－300 超滤膜（平均孔径 0.025μm）平均透水率高于 Diapor 0.2μm 微滤膜（图 6－14）。Henry 和 Allred 也发现用 XM－300 超滤膜浓缩细菌悬浮液时，透水量比 0.22μm 微孔膜高。需要说明的是 XM－300 膜是不对称的，而微滤膜是对称的，这对膜污染特性有一定影响。

由上述可知，不同对象的最佳孔径膜需用实验来确定，因为在不同的发酵液中，最小细胞

粒子与特性不同。

(2) 组件结构 当发酵液中固含量较低且产物在透过液中时，发酵液首先是要澄清，则选择组件结构余地较大。若截留物是产物，则组件结构选择要慎重。一般来讲，不宜采用隔网作料液流道的组件，因为固体物会在膜面沉积和清洗困难。而毛细管式与薄流道式组件设计可以使料液高速流动，即剪切力较大，从而有利于减少粒子在膜面沉积，减少浓差极化或凝胶层形成。Patel[11]用中空纤维超滤组件浓缩酵母时，料液流速可保持在>1m/s，透水速度高达 40～50L/(h·m²)，细胞回收率大于 99%。相反，用褶叠式错流组件时，由于料液流道中有隔网，料液流速被限制在<0.1m/s，导致污染快得多及细胞回收率降低。值得提及的是 Hanisch[16]等用中空纤维膜和平板膜盒以错流过滤浓缩大肠杆菌，比较了它们透水量随运行时间的变化(图 6－15)。他们认为，在用中空纤维膜错流过滤浓缩大肠杆菌时，存在“管子挤压作用”(Tubular Pinch Effect)，即当粒子流过一根管子时，这些粒子明显迁移离开管壁和管轴，而在一些不同圆心的径向位置达到平衡状态，粒子以链状平行于管轴有规则地排列在空间，所以透水量衰减较慢。当粒子被浓缩到一临界浓度时，即平衡位置上粒子也达到饱和，这时，净粒子传递已向膜面，所以透水量开始急骤下降。对一给定品种液体，临界浓度是个定值。而在用平板膜盒错流过滤浓缩大肠杆菌时，透水量衰减遵循粒子浓差极化的理论(图 6－15b)。

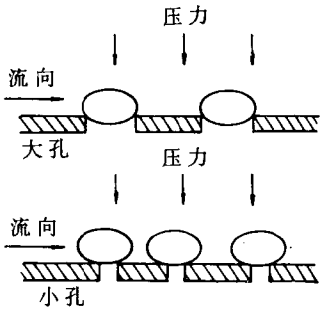


图 6－12 膜孔径与粒子大小对膜污染影响示意图

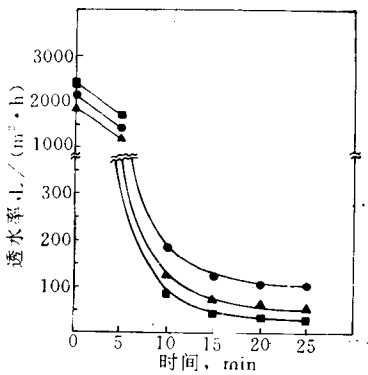


图 6－13 膜孔径大小对透水率的影响

●—0.45μm； ▲—0.80μm； ■—1.20μm

(3) 膜的化学特性 膜的化学特性对其与被分离溶质间的相互作用有决定性影响。一般而言，电荷相互作用是较常见的，如 Patel[11]发现酵母细胞在溶液中带有负电荷，因而用带有负电荷的膜来分离浓缩它时，污染速度慢得多。这与处理电泳漆时，用与漆带有相同电荷的膜

来处理电泳漆废水可以大大减少膜污染、易于清洗的原理完全一样。所以在用膜来收集细胞时，对膜化学特性的选择至关重要。

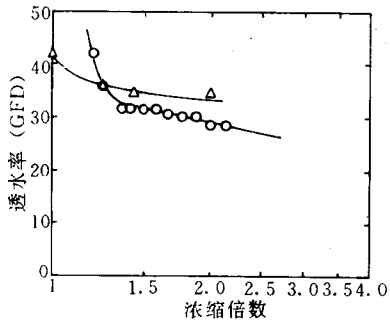


图 6－14　膜孔径大小对膜透水率的影响

△— XM－300；　○—Diapor 0.2μm

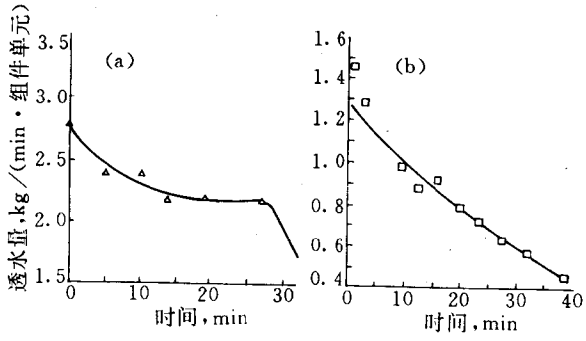


图 6－15　透水率随运行时间衰减的关系

(a)　中空纤维膜；　(b)　平板膜盒

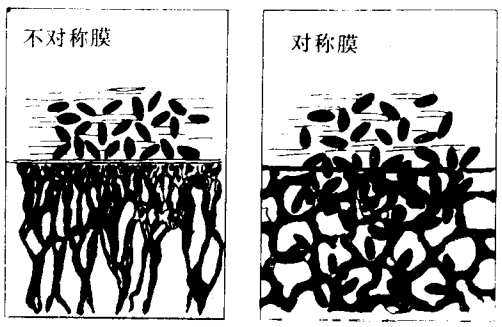


图 6－16　膜结构对膜污染的影响示意图

(4)　膜的结构　正如在微滤膜结构与分离特性中讲到的，近年来不对称结构微孔膜发展取得重大进展。与对称结构微孔膜（弯曲孔膜）相比，在错流过滤时不对称微孔膜有更强的耐污染性，其原因从图 6－16 可得到直观理解。由于在错流过滤时，与对称膜孔径尺寸相近的粒子可能被截在膜的一定深度上产生堵塞（即产生不可逆的污染），因而最好选择不对称微滤膜来收集细胞。

(5)　操作参数的选择　操作参数包括料液流速、压力、pH 值、离子强度和温度等。高的料液流速通常可以减小浓差极化或沉积层的形成，提高透水量。但要考虑有些生物产品对剪切力敏感，必须选择合适的料液流速。在浓差极化现象不严重情况下，通常可用增加压力来提高

透水率，但需用实验确定其限度，因为提高压力，会使浓差极化与膜污染加重，到一定压力后形成“凝胶层”，透水率不再随压力提高而增加。因此操作压力要合适，以不形成凝胶层为限。温度通常通过影响料液粘度对透水量产生作用，但在考虑升温时必须注意生物产品活性的稳定性。pH 值则对细胞荷 电性产生影响。因此对膜的类型选择应给予重视。

二、酶、蛋白质、抗体、多糖和一些基因工程产品的分离浓缩

由于它们分子量多在 $10^4 \sim 10^6$ 道尔顿之间，这恰好是超滤膜截留分子量范围，因此常用超滤技术来进行分离、浓缩、初分级与纯化。

1. 膜品种与膜规格的选择

不同膜材料，由于其亲水性不同，或荷 电特性不同，它们与被分离溶质间的疏水或库仑相互作用也不同，导致对某些生物分子在膜的表面或孔内吸附也不同，即膜污染程度不同。一般来讲，这是一个不可逆过程。它不仅对膜透水率影响很大，而且也会改变膜的截留分子量特性。虽然也有一些方法可测定吸附量，但文献上尚无系统数据。一般最实用的方法是把膜泡在被分离溶液中一定时间，然后测定其纯水透过率，或用溶液超滤一定时间(1～2h)后，用清水漂洗一下，再测其纯水透过率。用实验前后透水率之比，作为比较污染程度的参量，也相对反映出膜对蛋白质吸附量的多少。McGregor W. C.[5]对一些公司膜污染性能作了测定，结果列于表 6－9。

表 6－9　一些商业超滤膜性能

厂　家	商品号	标　称 截留分子量	实　测 截留分子量	实测透水率 ml/(cm·min)×10^2			A/B	A/C
				A	B	C		
Abcor	HFM－100	10 000	70 000	51	5.4	13	9.4	3.9
	HFM251	18 000	>>100 000	125	7.0	28	17.9	4.5
Amicon	PM 10	10 000	16 000	58	6.0	23	9.7	2.5
	XM 50	50 000	20 000	49	5.3	17	9.2	2.9
DDS	GR8P	10 000	12 000	8.7	2.0	2.2	4.4	4.0
	GR6P	25 000	20 000	33	5.4	9.5	6.1	3.5
	GR5P	65 000	76 000	17	5.4	5.1	2.6	2.7
Dorr Oliver	S－20	20 000	70 000	154	7.8	49	19.7	3.1
	S－30	30 000	70 000	162	7.8	40	20.8	40
	D－24	24 000	70 000	96	7.8	42	12.3	2.3
	K－100	100 000	>>100 000	168	2.1	8.4	80	20
Gelman	EXP	10 000	20 000	10	3.5	7.7	2.9	1.3
Millipore	PTGC	10 000	16 000	17	3.1	3.8	5.5	4.5
	PSED	25 000	>76 000	71	1.4	5.9	50.7	12
	PTHK	100 000	>76 000	149	7.4	87	20.1	1.7
Osmonics	SEPA－20K	20 000	(20 000)	49	7.6	26	6.4	1.9
Nucle－Pore	F 50	50 000	76 000	20	3.1	9.9	6.5	2.0
	F 100	100 000	76 000	43	3.5	7.6	12.3	5.7

2. 浓差极化

浓差极化是指在超滤过程中，由于水透过膜而使膜表面的溶质浓度增高，在浓度梯度作用下，溶质与水以相反方向向本体溶液扩散，在达到平衡状态时，膜表面形成一溶质浓度分布边界层，它对水的透过起着阻碍作用（如图 6－17），所以浓差极化会降低透水率。显然，浓差极化是一个可逆过程，即在停止超滤后，溶质扩散至均匀，浓度边界层消失，用清水洗膜并用纯水测透水率，应恢复到原水平。浓差极化受如下因素影响。

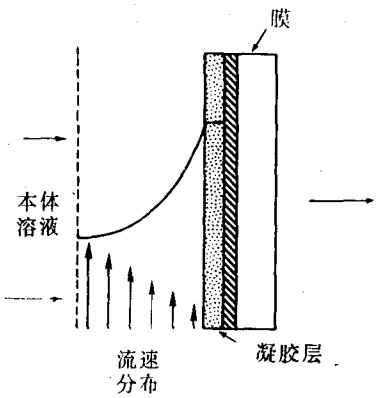


图 6－17　浓差极化边界层的形成

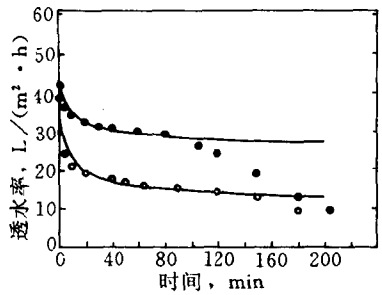


图 6－18　料液流速对膜透水率的影响
●—10 L/min；　○—3 L/min

（1）、料液流速　料液流速快，则加快溶质与水扩散速度，边界层厚度减薄，从而提高透水率（图 6－18）。若采用湍流器，即使料液产生紊流，也可大大减少浓差极化对透水率的影响。

（2）　溶质分子量大小　溶质分子量大，扩散速度慢，易形成浓差极化层。

（3）　溶液粘度　溶液粘度受溶质浓度、分子量大小、溶液温度、pH 值等影响。一般而言，溶液粘度高，分子扩散速度慢，易形成浓差极化层，因此对于高粘度料液，若不存在失活问题，采用较高温度为宜。

（4）　压力　所用压力越高，透水速度越快，膜表面溶质积累速度也加快，从而浓差极化现象严重，使透水率随压力增加呈现曲线增加。对于基因工程药物浓缩而言，由于其浓度很低，所以浓差极化现象不会很严重。

3. 膜污染

膜污染通常是指由于膜与溶质的相互作用而在膜表面和孔内吸附，或因浓差极化，在膜表面溶质浓度超过饱和浓度而在膜表面产生沉淀或结晶、形成“凝胶层”（图 6－17），引起膜性能变化的现象。它是一个不可逆过程。它不仅使膜的透水率降低，而且使其截留分子量变小；甚至在含量很低的基因工程产品分离中，由于膜的吸附而几乎得不到产品，通常它受如下因素的

影响。

(1) 膜的化学特性　膜的亲疏水性、荷电性影响膜与不同溶质间相互作用的大小。一般静电相互作用较易预测，而亲疏水性却很难预测。尤其对生物发酵系统，组成极为复杂，必须对不同对象，用各种膜进行实验选择。

(2) 蛋白质种类与溶液 pH 值　pH 值对蛋白质在水中溶解性及构型有很大影响。蛋白质一般在其等电点时溶解度最低，偏离等电点时，溶解度增加。Fan 等人用 PM30 膜超滤 0.1%牛血清蛋白，实验后测定膜吸附的蛋白质量。结果显示，在等电点时吸附量最高(图 6－19)，即膜污染最严重。另外 pH 值对不同膜与不同蛋白质间相互作用也产生影响。由于不同膜的亲疏水性、荷电性不同，不同蛋白质特性也不同，所以较难预测。对于荷电膜而言，当蛋白质荷电性与膜固定离子电性相同时，污染程度较小。一般认为强疏水膜与强亲水性膜与蛋白质相互作用较弱，较耐污染。

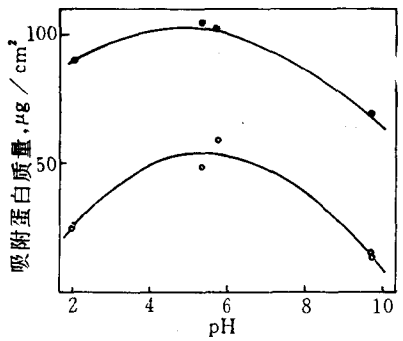


图 6－19　pH 值对膜吸附蛋白质量的影响
●—BSA＋0.2mol/L NaCl；○—BSA（无盐）
(BSA 为牛血清蛋白)

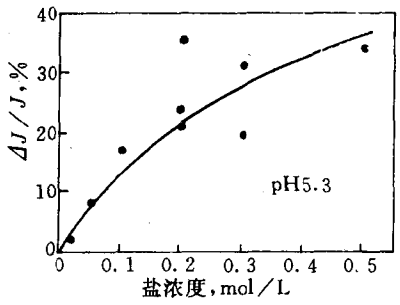


图 6－20　盐浓度对透水率的影响

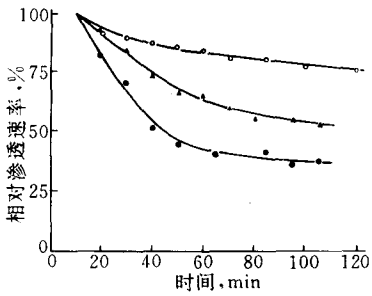


图 6－21　超滤温度对透过速度的影响
○—10℃；▲—20℃；●—30℃

(3) 盐　无机盐通过两条途径对膜污染产生重大影响。一是有些无机盐复合物会在膜表面或膜孔直接沉积，或使膜对蛋白质的吸附增强而污染膜。二是无机盐改变了溶液离子强度，影响到蛋白质溶解性、构形与悬浮状态，使形成的沉积层疏密程度改变，因此对膜透水率影响也不同。Fan 等人用 PM30 膜超滤 0.1%牛血清蛋白时，发现 NaCl 的加入会增加膜对蛋白质的吸附，但透水率则随 NaCl 加入量增加而提高。初看，这是矛盾的，实际上这是第二种途径在起作用的缘故。NaCl 的加入影响到蛋白质构形与悬浮状态，所以形成的“凝胶层”较疏松。虽然未加 NaCl 者吸附少，但形成的“凝胶层”较致密，反而使膜透水率降低得多(图 6－20)。但在作

者用超滤技术分离浓缩青霉素酰化酶时，发现无机盐〔NaCl、$(NH_4)_2SO_4$〕的加入对酶有增溶作用，所以对透水率有改进。因此无机盐对膜污染的影响与膜化学特性、待分离蛋白质特性及其溶液 pH 值息息相关，需进行综合考虑。

(4) 温度的影响 温度对膜污染的影响的原因尚不是很清楚，根据一般规律，溶液温度升高，其粘度下降，透水率应提高。但对某些蛋白质溶液，温度升高反而会导致透水率降低。这是由于在较高温度时，某些蛋白质溶解性下降的缘故。Maulois 用超滤浓缩甜乳清时即出现此现象(图 6－21)[23]。Dillman 等也认为在大多数有意义的超滤应用温度范围内(30～60℃)蛋白质分子的吸附随温度提高而增加[24]。但我们在分离浓缩青霉素酰化酶和凝乳酶时，却温度升高透水率增加。对于基因工程产品，由于其浓度较稀，且有失活问题，一般应在低于 10℃下分离浓缩为好。

(5) 料液浓度、流速与压力的影响 在超滤分离、浓缩蛋白质时，压力与流速对膜透水率影响通常是相互关联的。当流速一定及浓差极化不明显之前(低压力区)，膜的透水率随压力增加而近似直线增加；在浓差极化起作用后，则由于压力增加，透水率提高，浓差极化也随之严重，从而透水率随压力呈曲线增加。当浓差极化使膜表面溶质浓度达到极限浓度(C_G)时，溶质在膜表面开始形成"凝胶层"。此时"凝胶层"阻力对膜的透水率影响起决定性作用，透水率不再依赖于压力，即压力再提高，透水率几乎不变(或称之为平衡透水率)。当流速提高或料液浓度降低时，达到 C_G 时的压力升高，平衡透水率也升高(图 6－22、图 6－23)[25]。因此通过增加压力提高透水率，必须考虑采用的料液流速、压力要低于形成"凝胶层"的压力。

4. 清洗

在任何膜分离技术应用中，都会碰到膜污染问题，即膜透水量随运行时间增长而下降，即使选择较合适的膜与适宜操作条件，仍有透水量缓慢下降问题。因此必须采取一定的清洗方法除去膜面或膜孔内的污染物，达到透水量恢复的目的。显然，清洗方法选择得当，膜透水量就恢复得好。对于不同处理目的与不同处理对象，清洗膜的方法与程序也有所不同，但一般首先要考虑以下两点。

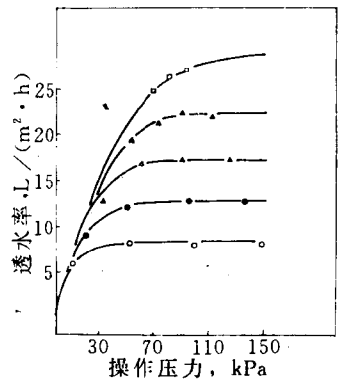


图 6－22 压力、流速及料液浓度对透水率的影响

流速：□—1.97 m/s；▲—1.53 m/s；△—1.11 m/s；●—0.71 m/s；○—0.34 m/s

条件：脱脂牛奶 (19.1%固含量)；60℃

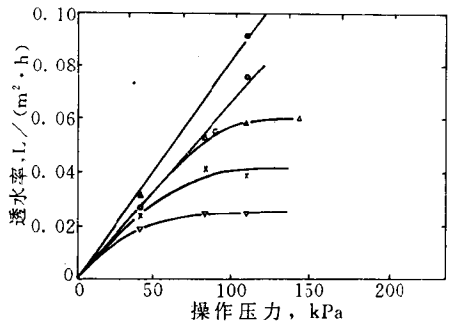


图 6－23 压力与流速对透水率的影响

◔—0.9%盐；○—0.65%蛋白(1830RPM)；△—3.9%蛋白(1830RPM)；×—6.5%蛋白(1830RPM)；▽—6.5%蛋白(880RPM)

(1) 膜的化学特性 膜的化学特性(如耐酸、碱性、耐温性、耐氧化性与耐化学试剂特性)对选择化学清洗剂类型、浓度极为重要。一般来讲,生产厂家都给出简单说明。

(2) 污染物特性 污染物特性要考虑诸如溶液的 pH 值、不同种类盐及其浓度和温度等对其溶解性的影响、可氧化性及可酶解性等。

清洗方法通常可分为物理方法与化学方法,已有大量专利文献报导。物理方法一般指用高流速水冲洗,对于平板膜片可用海绵手工擦洗;对于管膜已发展出用海绵球清洗装置;而对于中空纤维膜,则可用反洗(图 6-24、图 6-25)。化学清洗通常是用化学清洗剂(如稀碱、稀酸、酶、表面活性剂、络合剂和氧化剂等)对膜进行清洗。对于不同种类膜,在选择化学清洗剂时要慎重,以防止化学清洗剂对膜的损害。在某些应用中,温水清洗即可基本恢复初始透水率(如多糖)。在大多数膜的应用中,稀碱是一种有效清洗剂。对于蛋白质污染严重的膜,用含 0.5%胃蛋白酶的 0.01mol/L NaOH 清洗 30min 可有效恢复透水量。

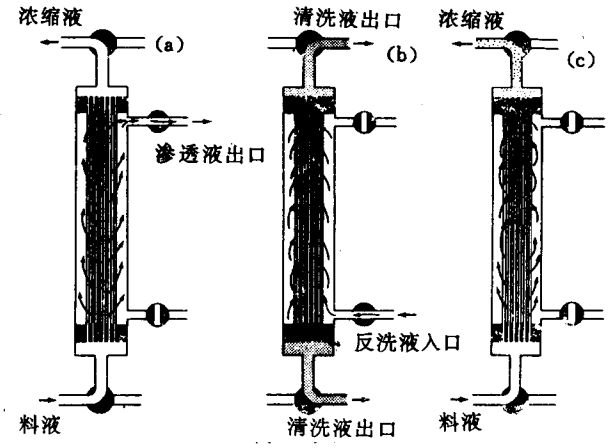


图 6-24 中空纤维膜组件操作与清洗方式示意图

(a) 操作; (b) 反洗; (c) 循环清洗

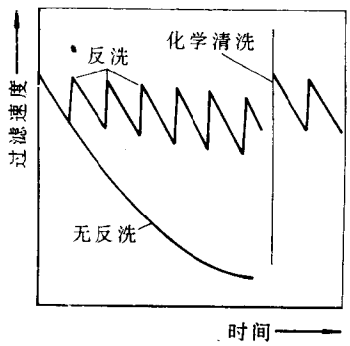


图 6-25 清洗程序对膜性能的影响

McGregor 发展了用于中空纤维膜制备无内毒素产品的清洗膜程序:

(1) 在过滤生物高分子后,把装置用蒸馏水清洗一下,接着用 0.2%NaOH 洗一段时间;用蒸馏水洗去残余碱,再用 0.1%HCl 正洗,然后用蒸馏水洗去残余酸;

(2) 用 45℃ 2% Micro 洗涤剂溶液循环运转 15min;

(3) 排干溶液，并用蒸馏水循环漂洗出全部洗涤剂，大约需洗 6 次；

(4) 用 0.2% NaOH 溶液反洗一段时间，用蒸馏水洗去残余碱；

(5) 用 0.1% HCl 溶液正洗一段时间，然后用蒸馏水漂洗 6 次，并用蒸馏水浸泡备用。

采用上述清洗流程，膜的透水率可基本恢复，而且无内毒素。

值得提及的是无机膜不仅可高温消毒、反冲洗，而且可用热碱液或强氧化剂清洗，但遗憾的是目前无机膜价格昂贵，品种与规格也较少。

三、超滤分级

鉴于现有超滤膜切割分子量敏锐性较差和浓差极化与“凝胶层”对膜截留分子量的影响，在用超滤膜进行生物发酵液产品初分级时，必须慎重选择膜的截留分子量与生物产品分子量之间的差距。一般分级原则是在足够稀的浓度下，分子量相差应在 10 倍以上。若小心地使溶质-溶质、溶质-膜的相互作用减至最小，即在选择不同材质膜时选择对生物产品吸附性小、切割分子量较敏锐的膜，并采用合适的操作条件，也可分级分子量差别较小的两种蛋白质。

四、除水中热源

水中热源对注射用水及细胞培养用水是个很大的问题。大多数热源是从细胞壁来的脂多糖，其分子量范围从 20000 道尔顿到 0.1μm 聚集体。它不能通过高温消毒或微滤来去除。但用合适的超滤膜可有效除去之。一般认为，截留分子量 10000 道尔顿的膜在透水率与截留性上最佳[1]。

第五节 组件结构

目前用于生物产品分离浓缩的超滤组件有中空纤维式组件(图 6-26)、膜盒式(图 6-28)、卷式组件(图 6-27)。这 3 种组件都具有膜面积装填密度大的特性，但后者对发酵液前处

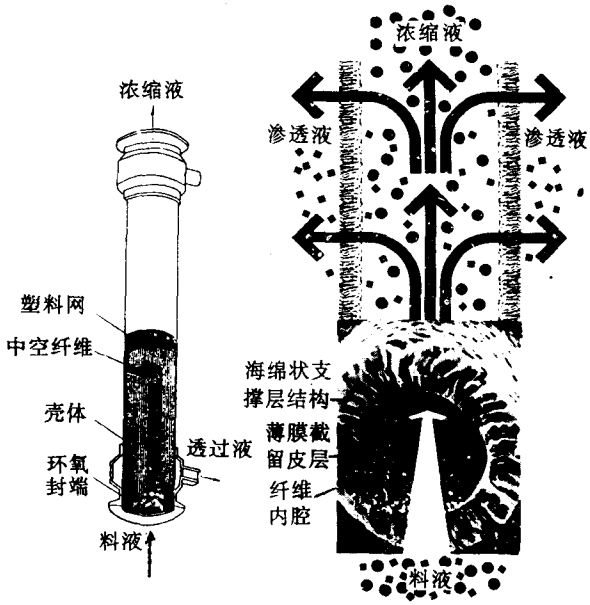


图 6-26 中空纤维膜组件及超滤原理示意图

●—高分子量溶质（被膜截留）；■—低分子量溶质（不截留）；←—溶剂

理要求较严。对于前二者，若选择合适大小流道的组件，可降低发酵液前处理标准。中空纤维组件又分内压式与外压式。由于内压式料液分配均匀，流动状态好，而外压式料液流动不均匀，所以生物工程后处理中多采用内压式组件，尤其对于菌体分离浓缩更具特点（见第四章的一、2.）。

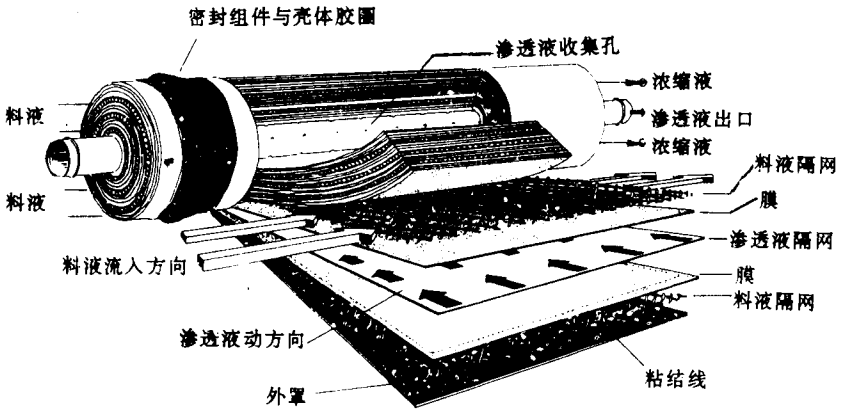


图 6－27　螺旋卷式组件示意图

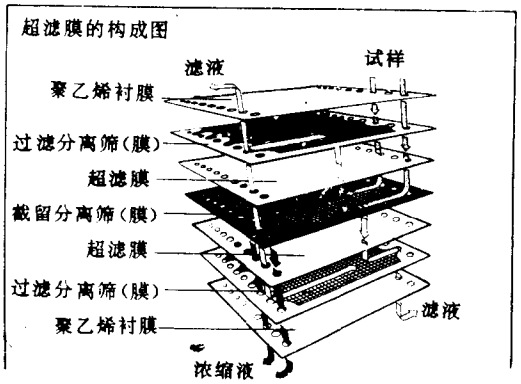


图 6－28　Millipore 膜盒的流动途径示意图

第六节　系统设计

在欲用超滤技术分离浓缩生物产品时，通常关心的是：(1)要浓缩到希望的浓度；(2)产品回收率；(3)处理时间与所需要的膜面积。

对于分离、浓缩生物产品，一般程序如下。

(1)　用杯型超滤器选择合适的膜材料与膜规格，定性选择操作条件。

(2)　用相应膜材料与规格的中空纤维膜小组件先测纯水透过率，再实验料液流速（通常在 0.1～0.15MPa 压力下）对透水率与欲分离生物制品活性及截留率的影响，了解膜污染对膜透水率的影响程度。

(3)　清洗膜组件后，先用料液在选定的 pH 值、压力、料液流速下运行 4～8h，作出透过

率与运行时间的关系曲线，找出稳定后的透水率，并测定此时截留率。把料液进行浓缩，作出透水率与浓缩倍数的关系曲线，找出达到浓缩浓度时的浓缩倍数那点透水率，测定初始与最终二点的截留率。

(4) 根据预定处理量与处理时间，进行系统的设计[1]。

通常采用的操作方式有间歇式和连续式(图 6-29、图 6-30)。对于间歇式，在上述实验基础上，可计算下述参量。

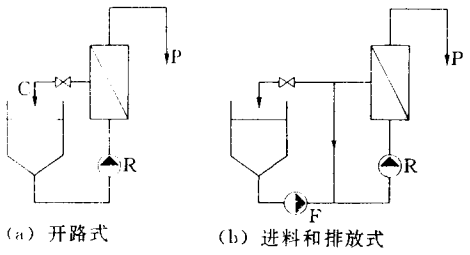


图 6-29 超滤单元的间歇操作

C—浓缩液； P—渗透液； F—料液泵； R—循环泵

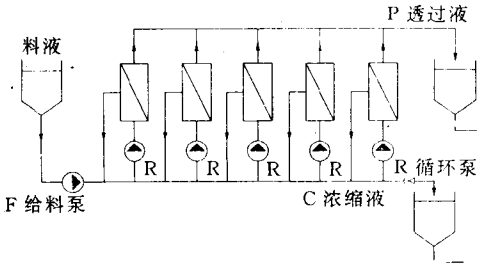


图 6-30 连续超滤操作示意图

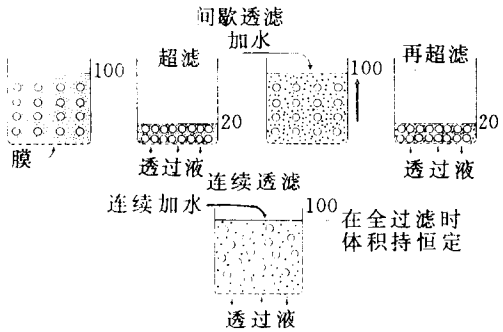


图 6-31 间歇与连续透滤示意图

a) 浓缩液中组分浓度 C 的计算

根据下式可以计算任一时间的各组分浓度。

$$C=C_0\left(\frac{V_0}{V_c}\right)^R \tag{6—1}$$

式中，C 为任一时间时某组分浓度；C_0 为该组分初始浓度；V_0 为初始料液体积；V_c 为该时间浓缩液体积；R 为膜对该组分的截留率。

若截留率随料液浓缩过程变化不大，可取平均截留率作估算。若变化较大，则应在实验过程中多测几个截留率，进行分段平均处理。一般来讲，对于欲浓缩的生物产品，其截留率均很高(>98%)，故采用初始截留率或平均截留率即可；但若考虑在浓缩的同时要有纯化作用，则必须考虑各组分截留率变化情况，以便估算。

b) 特定组分产率 Y 的计算

$$Y=\left(\frac{V_0}{V_c}\right)^{R-1} \tag{6--2}$$

c) 平均透水率 $\overline{J}$ 的估算

$$\overline{J}=J_f+0.33(J_i-J_f) \tag{6--3}$$

式中，J_t 是在预定浓度时的膜的透水率；J_i 是原液循环时的稳定透水率。

d） 需要的膜面积 S 的估算

$$S=\frac{V_0-V_c}{Jt} \tag{6—4}$$

式中 t 为预计处理时间(h)。

一般而言，实际应用的膜面积应是计算的膜面积的 1.5～2.0 倍，因为测定透水率的时间与长期应用相比太短。

在生物工程应用中，有时虽然目标产物浓度或活性达到应用要求，但小分子(如盐等)浓度偏高，必须加水(或缓冲液)稀释，然后再超滤浓缩，以降低小分子含量。这一过程有人称之为“透滤”(diafiltration)。透滤和浓缩一样，有两种操作方式：连续式与间歇式(图 6－31、图 6－32、图 6－33)。对于间歇式，若每次加水体积与原液体积相等并浓缩到初始体积，则进行 n 次稀释浓缩操作后，溶质浓度 C 为：

$$C=C_0\left(\frac{V_0}{V_c}\right)^{1+n(R-1)} \tag{6—5}$$

式中，C_0 为第一次稀释后的初始浓度；V_0 为稀释后的体积；V_c 为浓缩后的体积；n 为稀释次数；R 为膜对某组分的截留率。

假如每次加水体积和截留率有变化，则可用方程(6—6)计算。

$$C=C_0\left(\frac{V_0}{V_c}\right)_1^R\cdot\left(\frac{V_0}{V_c}\right)_2^{R-1} \tag{6—6}$$

式中，$()_1$ 为第一次稀释浓缩比；$()_2$ 为第二次稀释浓缩比，依次类推。当采用连续透滤时，则定义稀释体积比 V_D 为：

$$V_D=\frac{V_P}{V_0} \tag{6—7}$$

式中，V_P 为透过液总体积；V_0 为料液初始体积。

某一时间某组份浓度 C 为：

$$C=C_0e^{-V_D(1-R)} \tag{6—8}$$

产率 Y 为：

$$Y=e^{-V_D(1-R)} \tag{6—9}$$

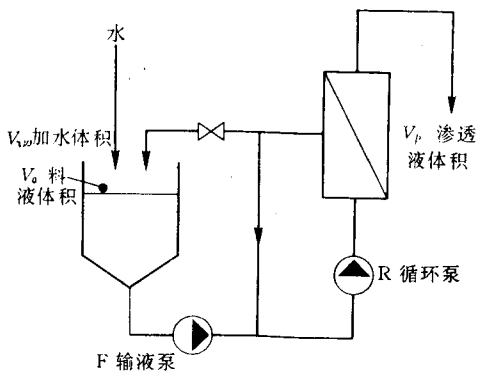


图 6－32 半连续间歇透滤示意图

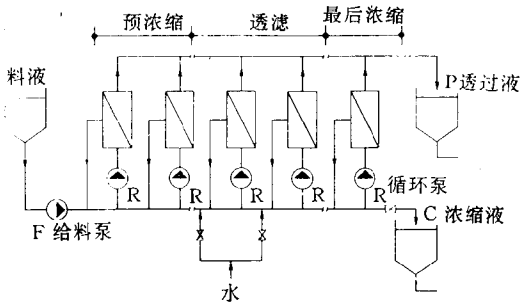


图 6－33　加水连续透滤示意图

表 6－10　某些系统的 C_G 值

材　料	C_G		参考文献
脱脂牛奶	22%	蛋白质	29
	20%～22%		26
	20%		27
	25%		28
全脂牛奶　(3.5%脂肪)	9～11%	蛋白质	30
大豆萃取物	10%	蛋白质	31
脱脂大豆粉萃取物	20%～25%	蛋白质	32
乳　清	30%		25
	20%		29
	28.5%		33
人血清蛋白	44%		34
	24%		35
	28%		34
免疫血清球蛋白	19%		35
牛血清蛋白	30%		34
	20%		36
红血球 Porcine	45%		27
Porcine Bloox Plasma	35%		37
明　胶	20%～30%		36
	30%		38
鸡蛋白	40%		36
人血浆	60%		36
人血(HCT－21)	28.7%		39

当一种溶液需要浓缩和连续脱盐时，在稀溶液脱盐时虽然透水率高，但要处理的体积也大，最终还要把产物浓缩到一定浓度。若浓缩到需要浓度，则可能因浓度过高、透水率过低，使脱盐时间太长。假定浓缩过程中传质系数不变，溶质被全部截留($R=1$)和该溶质饱和溶解度 C_G 不变，则可用 Mg 等人提出的下式计算脱盐时最佳溶质浓度(C_B^*)。当然若希望浓缩的溶质

浓度小于 C_G，则不必考虑上述问题。

$$C_B^* = \frac{C_G}{e} \tag{6—10}$$

表 6－10 给出某些蛋白质的 C_G 值。

第七节　超滤亲和纯化[40]

随着基因生物工程的发展，具有高分离效率的大规模初分离手段需求日益迫切。虽然超滤分级已显示其特点，但其纯化效率尚较低。众所周知，亲和色谱是纯化基因工程产品的关键手段，它具有极高的纯化效率，但它的致命弱点是处理量小，工业化困难，载体制备昂贵。而超滤亲和分离技术则把超滤技术的优点与亲和技术的优点结合起来，它具有分离纯化效率高和易于大规模工业化的优点，其基本原理示于图 6－34。它基本包括以下 4 个步骤。

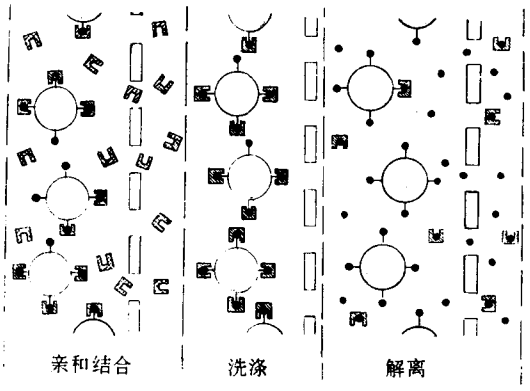


图 6－34　超滤亲和纯化原理图

(1)　亲和结合阶段　把去除颗粒物后的粗料液与大分子亲和基混合，大分子亲和基与欲分离的生物产品分子有选择地发生亲和结合，形成高分子量的复合物。

(2)　洗涤阶段　用选择合适截留分子量的超滤膜进行透滤，由于复合物分子量远大于溶液中其它成份的分子量，所以仅复合物被截留而得到纯化。

(3)　解离阶段　采用加入低分子亲和基或改变溶液条件(如 pH 值、离子强度)等方法使复合物解离，并进行超滤。解离下的产品分子透过膜，进一步采取浓缩、纯化方法便得到产品。

(4)　再生阶段　解离后的大分子亲和基溶液用超滤方法除去低分子亲和基或使溶液条件恢复原始状态，以备再用。

在实验时，要考虑如下几点。

(1)　大分子亲和基要尽量选择分子尺寸大的，因为可以选择尽量大孔径的膜，从而可以完全去除杂蛋白质并有高的透水量，使洗涤时间缩短。

(2)　亲和结合是一种平衡过程，如图 6－35 所示。显然，P 可以透过膜。

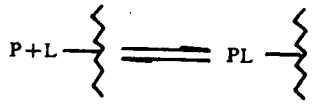


图 6－35　亲和结合的平衡过程

因此会使平衡向左移动，若洗涤时间太长，产物损失也就严重，所以在保持复合物截留率的前提下希望用高透水量膜。

(3) 亲和结合强度要适中。亲和结合强度太弱，游离态产物多，洗涤时损失严重。若结合太牢固，会给解离带来困难，并且采用苛刻条件解离会使产品失活。

Mattiasson 等人用死酵母作大分子亲和基超滤亲和分离 Concanavalin A 。由于 Concanavalin A 分子量为 102 000，他们采用 1 000 000～3 000 000 截留分子量膜。小分子亲和基是用葡萄糖。解离液再用截留分子量为 75 000 的超滤膜浓缩，除去小分子亲和基，可得相当纯的产品，结果示于图 6－36。由图可知，第一个峰是洗涤液峰，虽然蛋白质含量很高，但生物活性很低。第二个峰是解离液峰，生物活性很高，证明分离效果很好。一个连续亲和超滤分离流程示于图 6－37，其中洗涤、解离和再生用的膜组件一样，而浓缩用的组件截留分子量要小于产物分子量。

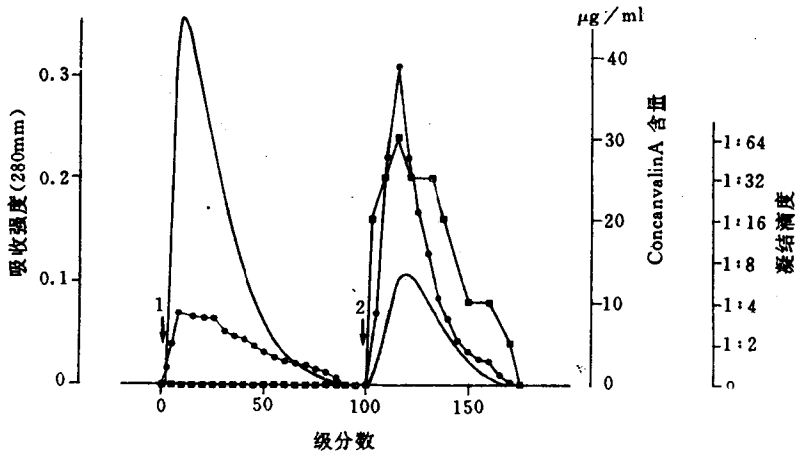


图 6－36 Concanavalin A 分离洗提图

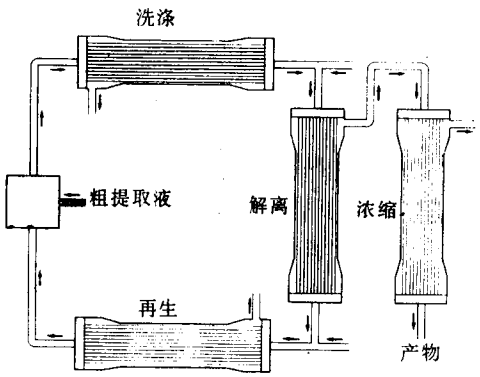


图 6－37 连续超滤亲和纯化示意图

第八节 膜反应器

用酶或微生物作为催化剂进行化学或生物转化已在有机化工、食品工业、医药和其它生物工程中越来越广泛地得到应用。但在常用的传统间歇式反应器中，酶或微生物是处于游离或溶解状态，存在如下缺点。

(1) 由于有开、停过程，设备利用效率低。

(2) 生产能力低，从而设备费用高。

(3) 不同批次产品质量有一定变化。

(4) 在反应结束时，需分离酶或微生物，或者使其失活，因而增加了费用。

(5) 由于用的生物催化剂浓度较低，且有时有产物抑制效应，所以完成反应时间长。

若采用固定化酶，则有如下优点。

(1) 可发展更有效的连续工艺。

(2) 固定化酶可反复使用多次，降低了酶的费用。

(3) 具有更好的工艺控制能力。

(4) 可提供质量稳定的产品。

(5) 总反应速率较高。

但也有如下缺点。

(1) 在酶固定化时，酶活性往往会损失，根据不同酶与不同固定化方法，损失率可从10%到90%。

(2) 酶与基物反应时，会因空间位阻或扩散困难而影响酶活性发挥作用。

(3) 固定化费用较高等。

酶固定化的方法有包埋、胶囊、离子交换、表面吸附、交联、共聚合反应和共价键固定化等，它们各有其优缺点，但总的来讲，酶活利用率较低，且再生困难。近年来，人们越来越对用膜把酶或微生物限制在一定范围做成膜反应器给予极大重视。因为它克服了固定化酶存在的缺点，而且操作比较简单，可以建立数学模型进行计算及选择不同截留分子量膜以适应不同基物与产物的要求。当酶或微生物失效后，更新容易。

连续搅拌式膜反应器(Continuous Stirred Tank Reactor, CSTR) 从结构和操作方式上可分为3类：一种是死端池(DESC)（图6－38)；另一种是Porter等人提出的循环流动型反应器(图6－39) (CCSTR)；第三种是阻塞流式中空纤维膜反应器(图6－40、图6－41)。对于前者，通常适用于实验室进行特定操作原理性实验或酶作用机理研究。它的主体实际上是一个杯型超滤器，池子既作为反应器，又作分离器。酶或微生物溶液放在超滤器7中混合。基物则放在贮罐5中，在气体压力下不断输送入7中，与酶混合接触反应，产物不断透过膜到产物收集器13。尽管超滤器中装了磁力搅拌子，使溶液混和均匀并产生一定速度，但流动状态仍然较差，所以浓差极化严重，尤其当基物是大分子时更严重，甚至易形成凝胶层。这就带来两个问题：一是降低了分离速度；二是由于在凝胶层中酶的构象变化及与基物接触机会少，从而影响酶活反应效率与降低生产能力。

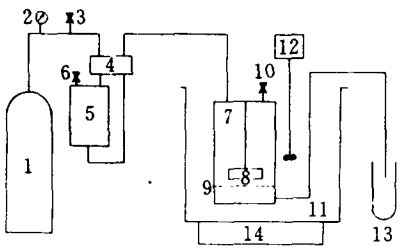


图6－38 死端池搅拌式膜反应器示意图

1—气源；2—压力计；3—气阀；4—三通阀；5—基物贮罐；6—放气安全阀；7—反应池；8—磁力搅拌子；9—膜；10—安全阀；11—恒温水浴；12—水浴搅拌器；13—产物收集器；14—恒温加热器

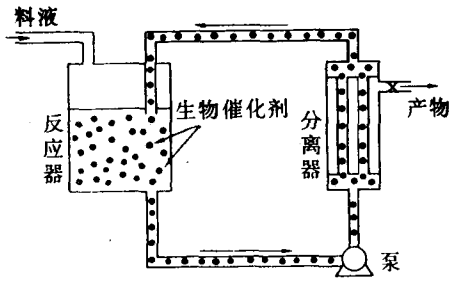


图 6－39　循环流式膜反应器

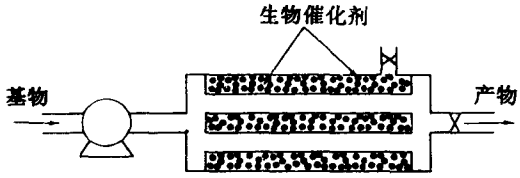


图 6－40　管式中空纤维膜反应器示意图

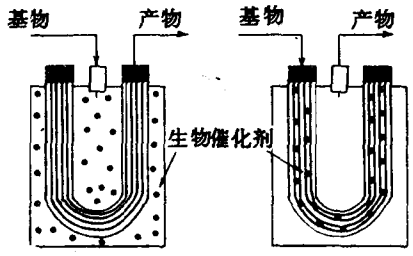


图 6－41　杯式中空纤维膜反应器示意图

循环流动型反应器具有如下优点。

(1)　反应器与分离器是分开的，因此具有更大适应性。可在反应器中调节合适混合速度以得到最佳反应速率，而在分离器中控制料液流速以减小浓差极化。

(2)　可用于基物分子量与生物催化剂分子量在同一数量级时的反应，产生的小分子产物可连续除去。

(3)　可以任意调节反应器与分离器大小之比，以控制稳态操作条件。

(4)　有较大生产能力。

Cheorygan 等人[42]提出串联使用设计。

当基物与产物都是小分子时，均能扩散透过膜，则可采用第三类反应器。烧杯式中空纤维膜反应器，既可把生物催化剂放在纤维膜外面(烧杯里)，又可把生物催化剂放在纤维膜内腔。而对于中空纤维管式反应器，通常把生物催化剂放在壳体侧，纤维膜内腔流基物溶液。此类反应器的特点是：

(1)　生物催化剂装填浓度可以很高，而体积很小。

(2)　可用很细的中空纤维膜组件，从而可得到很大的传质表面积。

(3)　当酶或微生物失活后，很易清洗更换。

一些用膜反应器研究酶反应的示例列于表 6－11。

表 6－11　用膜反应器研究酶反应的一些示例

酶 或 基 物	反应器类型	参考文献
Acylase（酰基转移酶）	HFER	43
Alcohol dehydrogenase（醇脱氢酶）	HFER	44
Alfalfa protein with proteases（蛋白酶水解苜蓿蛋白质）	DESC	45
Cellulose hydrolysis with cellulase（纤维素酶水解纤维素）	DESC	46
	Recycle	47
Cellobiose hydrolysis with β－giucosidase（葡糖苷酶水解纤维β－二糖）	DESC	48
	DESC	49
Cottonseed protein with pepsin and molsin（胃蛋白酶水解棉子蛋白）	Break HFER	50
Fumaric acid hydrolysis using fumarase or aspartase（富马酸酶或天冬酶水解富马酸）	DESC	51
β－galactosidase（lactase；hydrolysis of lactose or ONPG）	HFER	52
（β－半乳糖苷酶（乳糖酶；乳糖水解或 ONPG））	HFER	53
	HFER	54
	Recycle	55
Glucose isomerase（葡萄糖异构酶）	HFER	56
Lipase；synthesis of glycerides（脂肪酶；甘油酯的合成）	Psrallel Plate	57
	Recycle	
Maltose hydrolysis（麦芽糖水解）	HFER	58
Soy protein hydrolysis；Pronase，Alcalase（大豆蛋白水解；链霉蛋白酶）	Recycle	59
Starch hydrolysis；β－amylase（淀粉水解；β－淀粉酶）	Recycle	58
	DESC	60
Mixture of amylases（混合淀粉酶）	DESC	61
Glucoamylase（葡糖淀粉酶）	Tubular	62
	DESC	63

DESC：死端搅拌池；FE：纤维捕集；HFER：中空纤维膜酶反应器；Recyle：循环式。

第九节　电渗析与反渗透的应用

电渗析与反渗透技术已被大规模用于海水、苦咸水淡化，并与离子交换技术、微滤和超滤结合用于电子工业超纯水制备，因此生物工程中用的纯水、医药工业用的注射用水及血透中用的纯水均可用离子交换技术与几种膜分离技术组合制备。反渗透还可用于分子量为几百的氨基酸的浓缩。电渗析可用于蛋白质、氨基酸及多糖的脱盐。另一个重要的应用是该技术可根据各种氨基酸等电点的差别来进行分离纯化。图 6－42 给出不同氨基酸迁移示意图。开始时，把氨基酸放入中间室，根据等电点调好 pH 值，这样有的氨基酸为中性，一些荷负电，另一些则荷正电，中性者仍在中间室，而荷负电、荷正电者各向阳极与阴极迁移，从而达到分离目的。例如 *L*－丙氨酸和 *L*－天门冬酰胺酸，前者等电点为 6.1，后者为 2.98。把二者混和物放入中间室，可得到很好的分离（图 6－43）。

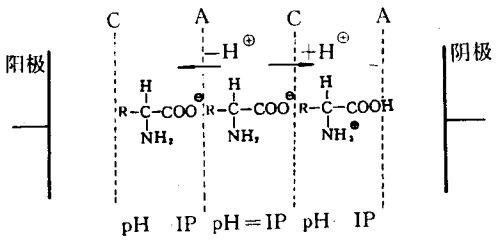


图 6－42　氨基酸迁移示意图

C—阳离子交换膜；　A—阴离子交换膜；　IP—等电点

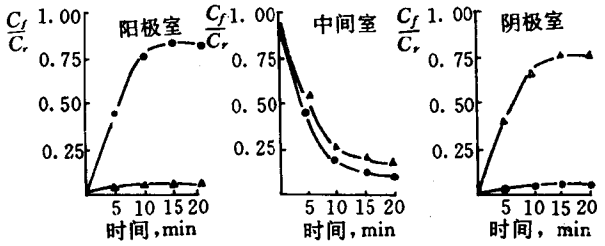


图 6－43　各种氨基酸在不同室中不同时间时的相对浓度

▲：*L*－丙氨酸，IP＝6.10；●：*L*－天门冬酰胺，IP＝2.00；pH＝4.0，　1.5mA/cm²

参考文献

1　Cheryan, M. Ultrafiltration Handbook, Technomic Publishing Company, Inc. ,Lancaster. Basel, 1986

2　Fane A. G. in Separation processes in Biotechnology. Juan A. Asenjo (ed) Marcel Dekker Inc. , New York and Basel. 1990

3　Strathmann H. in Synthetic Membranes: Science, Engineering and Application, P. M. Bungay, et al (ed) series C: Mathematical and physical sciences Vol. 181D. Reidel Publishing Company. 1986

4　Porter, M. C. (ed) Handbook of Industrial Membrane Technology Noyes Publicartins Park Ridge New Jersey, 1990

5　McGregor, W. C. (ed) Membrane Separations in Biotechnology, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 1986

6　Gutman, R. G. Membrane filtration－The technology of pressure－driven crossflow processes, Adam Hilger Bristal IOP Publishing Ltd. 1987

7　Bowden, C. P. , The World Biotech Report. Vol. 2: U. S. A. 1984　P. 139

8　Merin, V. et al. N. I. J. Dairy Sic. Technol, 1983, 18:153

9　Tutunjian, R. S. , Der. Indust. Microbiol, 1984, 25:415

10　Rogors, P. L. et al. Process Biochem. , 1980,15:7

11　Patel, P. N. , M. S. Thesis, University of Illinois, Urbane. 1985

12　Radlett, P. J. , J. Appl. Chem. Biotechnol, 1972, 22:495

13　Le, M. S. et al. The World Biotech Report, Vol. 2. U. S. A. , Onlie Publishers, UK, 1984, p. A97

14　Porter, M. C. et al. CHEMTECH, 1971, 1:440

15　Henry, J. D. et al. Dev. Ind. Microbiol. , 1972, 13:177

16　Hanisch, W. in Membrane Separations in Biotechnology. McGregor, W. C. (ed) Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 1986

17　Porter, M. C. in Membrane Separation Processes, 1989

18　McGregor, W. C. in Membrane Separations in Biotechnology: (ed) Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1986

19　Busky, T. F. et al. Biophys. J. 1979, 25:241

20　Melaren, A. D. et al. J. Phys. Chem. 1954, 58:129

21　Dillman, W. J. , et al. J. Colloid Interface Sci. , 1973, 44:221

22　Swaminathan, T. et al. Biotech. Bioeng. 1981, 23:1873

23 Maubois, J.K. J.Soc. Dairy Technol, 1980, 33:55
24 Dillman, W.J. et al. J.Coll. Interface Sci. 1973, 44:221
25 Cheryan, M., et al. J. Dairy Sci. 1984, 67:1406
26 Chiang B.H. Ph D Thesis, University of Illinois, Urbana, 1982
27 Delaney, R.A.M., J.Fd. Technol., 1977, 12:339
28 DeBoer, R. et al. Desalination, 1980, 35:169
29 Kessler, H.G., Food Engineering and Dairy Technology, Verlag, A. Kessler,W. Germany. 1981
30 Yan, S.H. et al. J. Dairy Sci., 1979, 62:23
31 Cheryan,M., J. Food Process. Engr., 1977, 1:269
32 Nichols,D.J. et al. J. Food Process Preserv, 1981, 5(2):104
33 Epstein,A. G. et al. Presented at 91st National Meeting of AIChE, Detroit, MI,1981
34 Porter,M.C., in Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers, P.A. Schweityer(ed)., McGraw-Hill, NY
35 Mitra, G. et al. Sap. Sci. Technol., 1980, 13:89
36 Porter, M. C. et al. Chem. Technol., 1972, 2:56
37 Delaney, R. et al. Wiss. U. Technol., 1975, 8:20
38 Akred, A.R. et al. Polymer Sci. Technol. 1980, 13:353
39 Issacson, K. et al. Polymer Sci.Technol., 1980, 13:507
40 Mattiasson B. et al. in Membrane Separation in Biotechnology, McGregor, W.C(ed) Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 1986
41 Porter M.C. et al. Chem. Technol. 1970, 1:59
42 Cheryan, M. et al. US. 4443540, 1984
43 Wandrey,C. et al. Adv. Biochem. Engr., 1979, 12:47
44 Fink,D. et al. Biotechnol Bioeng, 1975, 16:1029
45 Payne,R.E. et al. J. Food Sci., 1978, 43:385
46 Ohlson, I. et al. Desalination,1984, 51:93
47 Henley,R.G. et al. Microbial Technol., 1980, 2:206
48 Hong,J. et al. Biotechnol Bioeng., 1981, 23:1501
49 Pizzichini,M. et al. Acgua Aria,1984, (3):263
50 Cunouinghan S.D. et al. J.Food Sci. 1978, 43:477
51 Jandel,A.S. Etaeryan,M. et al. Process Biochem. 1984, 19(Dec):204
52 Leuris, W. et al. Biotechnol. Bioeng., 1978, 20: 102
53 Breslau, B. R. et al. USP 4266026, 1981
54 Kohlwey, D. K. et al. Eng. Microbial Technol., 1981, 3-64
55 Roger, L. et al. Le Lait. 1976, 56(551): 56
56 Korus, R. A. et al. J. Food Sci., 1977,42: 258
57 Hog, M. M. et al. JAOCS, 1984,61: 776
58 Engasser, J. M. et al. Chem. Eng. Sci., 1980, 35: 99
59 Cheryan, M. et al. Process Biochem., 1984,19 (Dec): 204
60 Azhar,A. et al. Biotechnol Bioeng., 1980, 23:1297
61 Mashall,J.J. et al. Chem. Industry, June 1971, 19:701
62 Madgavkar, et al. Biotechnol Bioeng., 1977, 19:1719
63 Fisher, E. E. USP 3720583, 1973

附录 6－1　国外超滤膜生产厂家及膜性能

厂名	类型	化学组成①	结构形式②	水透过系数 $m^3/(d \cdot m^2 \cdot MPa)$	MWCO 道尔顿×10^3	使用条件			
						pH	温度 ℃	压力 MPa	Cl $\times 10^{-6}$
ABCOR	HFA	CA	P	14	15	2～8	50	0.5	2
			T	14	15	2～8	50	0.4	2
	HFD	PA(?)	P	14	8	2～12	80	0.5	0
			T	35	8	2～12	80	0.4	0
	HFM－100	PVDF	P	18	10	0.5～13	90	0.6	10
			T	59	10	0.5～13	90	0.4	10
ABCOR	HFM－180	PVDF	P	18	18	0.5～13	90	0.6	10
	HFM－251		T	70	18	0.5～13	90	0.4	10
	HFK	?	P	18	5～10	2～14	90	0.6	
			T	60	5～10	2～14	90	0.4	
AMICON	YCO 5	?	P	2	0.5				
	YM 2	RC	P	1	1				
	5			4	5				
	10			6	10	2～11	75	0.5	
	30			50	30				
AMICON	PM 10	PS	P	100	10	1.5～13	75		
	30			300	30				
	XM 50			60	50			0.4	
	XM100A	Dynel	P	250	100	1.5～13	50	0.1	
	X300			250	300			0.1	
AMICON	P1		H.F.(1.1)	10	1				
	2		(1.1)	10	2				
ROMICON	5		(1.1/0.5)	20	5				
	10	PS	(1.1/0.5/0.2)	30	10	1.5～13	75	1.8	
	30		(1.1)	30	30				
	50		(1.1)	50	50				
	100		(0.5/1.1)	60	100				
	X 50		(0.5/0.2)	30～60	50	1.5～13	45	1.8	
ROMICON	100	Dynel	(0.5/0.2)	30～60	100				
	CX	丙烯类共聚物	(1.1)						
ASAHI	HL－HC －HH	PAN	HF(0.75)	10～70	6～50	2～10	50	2.9	

（续表）

厂名	类型	化学组成①	结构形式②	水透过系数 $m^3/(d \cdot m^2 \cdot MPa)$	MWCO 道尔顿×10^3	使用条件 pH	温度 ℃	压力 MPa	Cl $\times 10^{-6}$
		PS			3～6				
BERGHOF－	0.5			0.8	0.5				
/NUCLE－	BM 1		P	1.5	1				
PORE	或 A 5			7	5				
	10	PA	P	10	10	2～12	80		0
	50			32	50				
	100			55	100				
	BPR 2	PA	HF	2.5	2				
	或 A 10		(0.6/1.1)	30	10	2～12	80	0.2	0
	50			60	50				
	F 5		P	7	5				
	10			10	10				
	50			60	50				
	100	氟聚合物	P	90	100	1～14	130		高
	300			200	300				
	500			250	500				
	1000			400	1000				
NUCLE－	C 0.5			0.8	0.5				
PORE	1			1.5	1				
	5			8	5				
	10	改性纤维素	P	16	10	2～10	90		0
	20			25	20				
	50			80	50				
	100			160	100				
DAICEL	DUY－NH			5	5				30
	DUY－H	PAN	T	10	10		45		10
	DUY－M			16	20				10
	DUY－L		(14.5)	26	40				10
	DUS－40	聚醚砜	T	40	40		90		10
	PLS－HHA			3	5				
	PLS－HA	PAN	P	6	10		45		10
	PLS－MA			12	20				
	PLS－LA			20	40				

（续表）

厂名	类型	化学组成①	结构形式②	水透过系数 $m^3/(d \cdot m^2 \cdot MPa)$	MWCO 道尔顿×10^3	使用条件			
						pH	温度 ℃	压力 MPa	Cl $\times 10^{-6}$
D.D.S	CA 600P	CA	P	10	20	2～8	50	1	20
	800P			5	8	2～8	50	2	20
	GR 51PP			24	50			1	200
	60PP	PS	P	18	25	1～13	80	1	50
	61PP			24	20			1.5	200
	81PP			12	6			1.5	200
	FS 50PP			20	30			1	
	61PP	?	P	20	20	1～12	80	1	高
	81PP			12	6			1.5	
	GS 61PP			18	20				
	81PP	?	P	18	6	1～13	80	1.5	
	90PP			7	1.5	2～12	60	2.0	
DESALINATION SYSTEM	A	CA	P			3～9	40		
	E	改性聚砜				1～13	100		
DORR－OLIVER	C 2				1				
	5	CA	P		5	3.5～10.5	75		
	10				10				
	30				30				
	D 50				50				
	100	DYNEL	P		100	2～12	60		
	300				300				
	S 10	PS	P		10	1～13	75		
	30				30				
KALLE	TU AF20	CA	T		2～100	2～8	40	2	
	AG20		P						
	TU AK30	PA	P		20～100	2～12	60	1	
	AL30		T						
	TU AN4.	PS	P		8～25	1～14	90	1	
	AO4.		T						
MIL－LIPOR	PT GC		P	48	10				
	TK	PS			30	1～4		0.7	50
	HK			120	100				
MIL－LIPOR	PS AC			8	1				

（续表）

厂名	类型	化学组成①	结构形式②	水透过系数 $m^3/(d \cdot m^2 \cdot MPa)$	MWCO 道尔顿×10^3	使用条件			
						pH	温度 ℃	压力 MPa	Cl $\times 10^{-6}$
MIL－	PS ED	?	P	16	25	2～10			
LIPOR	PS VP			24	100				
NiTTO	NTU 2006	PO	T(11.5)	2	6				
	2020			10	20	1～13	50	1	
	2010			20	100				
	NTU 3020	PS	T(11.5)	45	20	1～13	60	1	高
	NTU 4206			1.5	6				
		PI	T(11.5)			2～8	40	2	
	4220			3	20				
	NTU 8010	PA	HF	50	10		60	0.3	
	8050			120	50				
OSMO－	SEPA CA0		P	6	1			1.4	
NICS	20	CA		23	20	2～8		0.7	5
	50			1	0.6		50		
	PS0	PS	P	12	1	0.5～13	50		
	20 K			46	20				
	50 K				50				
	PI 50	PI	P	0.5	0.6	4.5～11			0
PAT－	T2A		T(12.5)	1	1	2～8	30	2.5	1
TERSO	T4A	CA		6	10			1	1
CANDY	T6B	?	T(12.5)	3	20	2～11	60	1	10
RHONE	IRIS 303N	PAN	P	60	15	3～10	40	0.4	高
POU－	304			110	20		50	0.4	
LENC	305	共聚物		100	20	3～10	40	0.4	高
SAR－	SM 1453	CTA	P	60	10	4～8	50	0.4	
TORIUS	4				20				
SFEC	Carbosep	无机	T	10	10	1～13	95～120	2	高
		(ZrO/Carbon)		(6)	20		或		
		(ZrO/Alumina)		(15)	100		300		
TEIJIN	TU 10T			36					
	10L	PS	T	90					
	10S			90			90	1	
WAFILIN	WFS 8010		T(14－4)	12	20			1	
	6010	?		20	35	2～12	85	0.7	100
	5010			40	100			0.3	

（续表）

厂名	类型	化学组成①	结构形式②	水透过系数 $m^3/(d \cdot m^2 \cdot MPa)$	MWCO 道尔顿×10^3	使用条件			
						pH	温度 ℃	压力 MPa	Cl $\times10^{-6}$
	WFA 7010	?	T(14－4)	6					
	5010	?		12		2～10	55	—	30
	4010			20				0.9	
	3010			40				0.5	

① PS:聚砜;PI:聚酰亚胺;PAN:聚丙烯腈;PA:聚酰胺;PO:聚烯类;CA:醋酸纤维素;CTA:三醋酸纤维素;PVDF:聚偏氟乙烯。

② P:板式;T:管式(直径,mm);HF:毛细管或中空纤维式(直径,mm)。

附录 6－2　我国研制 MF、UF、RO 膜的单位

研究单位	膜材料	截留分子量（膜孔径）	纯水透过速率 $ml/(cm^2 \cdot h)$	膜类型	组件构成
北京环保所	CA PS PSA	20000～60000	10～18 (245kPa)	UF RO	内压管式 内压管式
北京工业大学	PS PSA PI PVC SPS 等	10000～60000	10～100	UF RO	平板 管式
中科院生态环境研究中心	CA PS CNCA PDC PEEK SPS PAN 等复合膜	3000～100000	3～120 0.8～2.0	UF RO	平板,管式,中空纤维 膜堆 卷式
中国电子工业设计院	CA	—	—		管式
中国纺织大学（上海）	纤维素	—	—		中空纤维
中科院大连化物所	PS PSA PA 复合膜	5000～100000	10～120	UF RO	中空纤维,卷式,平板
兰州铁道学院	CA PS	10000～60000	27(196kPa)	UF RO	管式
西北大学	CA－钛板	60000	50～100(490kPa)	UF	板式,管式
无锡化工研究院	CA	—	—	MF UF	褶筒,管式
天津膜分离工程研究所（天纺）	PS PA 复合膜 改性 PS	60000 20000 10000	3～4(98kPa) — —	UF RO	中空纤维 平板
上海医药工业研究院	CA PS PAN	10000～50000 70000	20(78kPa)	UF MF	平板式 中空纤维
上海原子核研究所	SPS	10000～60000		UF	管式,板式

（续表）

研究单位	膜材料	截留分子量（膜孔径）	纯水透过速率 ml/(cm²·h)	膜类型	组件构成
上海纺织科学研究院	PS	20000	8.6(196kPa)	UF	中空纤维
北京塑料研究所	PTFE	(0.2～10μm)		MF	平板
清华大学核能所	PC	(0.2～10μm)		MF	核孔膜
上海医疗器械研究所				UF	人工肾 中空纤维
国家海洋局杭州海洋二所	CA CTA 复合膜	10000～60000 (0.1～10μm)		MFUF RO	平板，卷式，褶筒，中空纤维
中科院广州化学所	CA CNCA	10000～60000		RO UF	平板
核工业部上海第八研究所		(0.2～10μm)		MF	褶筒
核工业部北京化工冶金研究院	PS PSA PVC CA	10000～100000		MF UF	平板 膜堆
北京化工学院	PVC	20000～60000		UF	平板
空军北京医院	CA	30000～60000		UF	管式
中国科学院高能物理研究所	PC	(0.1～10μm)		MF	核孔膜
轻工业部环境保护研究所	PAN			UF	平板 PAN 合成

附录 6－3　我国 RO、UF、MF 膜、组件、装置生产单位

(1989.11)

序号	生产单位	RO				UF				MF	
		卷	管	板	中空	卷	管	板	中空	板	褶筒
1	8217 厂(辽宁兴城)	Δ	Δ								
2	湖州水处理设备厂(浙江)	Δ			Δ	Δ	Δ				
3	济宁湖西水处理设备厂	Δ									
4	辽源工程塑料厂(吉林)					Δ	Δ		Δ		
5	宣武超滤设备厂(北京)								Δ		
6	大恒公司(北京)						Δ				
7	沙市水处理设备厂(湖北)						Δ				
8	武汉仪表厂								Δ		
9	无锡县红旗超滤设备厂						Δ			Δ	Δ

（续表）

序号	生产单位	RO				UF				MF	
		卷	管	板	中空	卷	管	板	中空	板	褶筒
10	常熟市膜分离试验厂		Δ						Δ		
11	长江水处理设备厂（常熟）								Δ		
12	济南槐荫超滤设备厂						Δ				
13	河北大城超滤设备厂								Δ		
14	北京化工厂劳动服务公司						Δ				
15	北京化工三厂							Δ			
16	无锡县藕城膜分离设备厂								Δ		
17	烟台招远纺织机械厂								Δ		
18	江西庆江化工厂（泰和县）									Δ	
19	山西榆次音响设备厂		Δ								
20	湖北襄樊化学矿山公司								Δ		
21	中原超滤设备厂（郑州）								Δ		
22	天津益民净化设备厂								Δ		
23	无锡县超滤化工设备厂						Δ				
24	上海新亚滤器厂							Δ	Δ	Δ	Δ
25	上海高东滤膜厂									Δ	
26	上海集成制药厂									Δ	
27	浙江海宁市医药器件厂									Δ	
28	上海第十制药厂									Δ	
29	无锡县雪浪制药化工机械厂						Δ				
30	无锡县黄巷利用加工厂						Δ				
31	哈尔滨亚麻厂						Δ				
32	旅顺铁山塑料配件厂							Δ			
33	旅顺塑料模具厂							Δ			
34	浙江湖州织里塑料电器厂										Δ
35	湖州膜分离设备厂（浙江）								Δ		
36	辽阳流体研究所（辽宁）						Δ				
37	上海医药工业研究院附属工厂									Δ	
38	59164 部队（天津）										
39	浙江海宁红星化工厂									Δ	
40	北京顺义水处理设备厂	Δ									
41	空军北京医院						Δ				
42	兰州空军医院							Δ		Δ	
43	高东净水器材厂（上海高桥）										
44	浙江温州化工机械厂										

（续表）

序号	生产单位	RO				UF				MF	
		卷	管	板	中空	卷	管	板	中空	板	褶筒
45	上海医疗器械厂								Δ		
46	浙江肖山塑料机械厂										
47	天津纺织工学院机械厂								Δ		
48	无锡县杨市纯水设备厂								Δ		
49	纺织部纺织科学院机械厂								Δ		
50	天津净美联合水处理设备厂							Δ			
51	湖南湘潭柴油机厂							Δ			
52	江苏宜兴超滤设备厂						Δ				
53	镇江汽车钢圈厂						Δ				
54	江苏沙州县大新 UF 设备厂						Δ				
55	辽宁旅顺化工厂									Δ	
56	北京昌平西沙屯环保设备厂						Δ				

第七章　生物大分子的色谱分离和纯化

耿信笃　　马　凤

（西北大学化学系现代分离科学研究室，西安，710069）

从现代分离科学理论计算得出，色谱和电泳是目前所知最好的两种分离方法，其塔板数可达百万数量级[1,2]。但是，因受各种因素的限制，电泳目前尚不能用于生产规模的生物大分子的分离和纯化[3]，这就是人们把分离和纯化生物大分子（包括蛋白质、酶、核酸、多糖等，以下简称蛋白）的研究重点放在色谱上的原因。从生物化工、基因工程等生产观点出发，对于那些与人类健康密切相关的治疗、诊断蛋白而言，重点又放在大规模制备色谱技术上。从多数蛋白纯化工艺来讲，色谱是产品包装前的最后纯化工序，换句话讲，在用色谱纯化之前须经其它方法的预分离，如用硫酸铵沉淀法以除去大部分杂蛋白和进行一些其它的处理，如蛋白复性等工艺[4]。但是，近几年陆续出现了全色谱分离和纯化治疗蛋白的工艺，使人们对于加宽制备色谱应用范围的研究更趋活跃。

纯化蛋白的设备和生产成本相当昂贵，以致在基因工程生产治疗蛋白的生产总成本中，分离和纯化要占 60%～80%。尽管如此，与治疗蛋白每克千万元的销售价格相比，制备色谱法仍是一个可以接受的技术，而且，因色谱技术的可塑性很强，如果应用得当，其成本可以成倍地降低，从而获得巨大的经济效益，所以色谱分离和纯化蛋白技术已成为目前许多生产基因工程产品公司进行商业竞争的热点。

当然，在蛋白纯化工艺中，色谱工序用得越多，愈接近全色谱纯化工艺，所遇到的困难就愈多。这是因为要考虑色谱所分离出的杂蛋白的种类和量要比传统方法多得多，这类杂蛋白可能有：热原、病毒、t-DNA、γ-DNA、不准确转化蛋白和糖化、氧化产物、聚集体和与目标产品有类似构象的异构体等，以及某些蛋白的复性工序所带入的新杂质。

色谱技术范围是如此之宽广，用于分离和纯化基因工程和其它来源的蛋白种类又是如此之多，在有限的篇幅内全面介绍和评述其新近发展是不可能的。本文着重介绍基因工程生产的治疗蛋白工艺和在分离和纯化中应用最多的几种色谱方法以及有关理论。

可依在分离时一次进样量的多少，将色谱分为分析（<10mg）、中等规模制备亦即半制备（10～50mg）、制备（0.1～10g）和工业生产（>20g/d）规模 4 大类[5]。当然，这并不是说在蛋白纯化进程中用中等规模制备和制备色谱就不能解决工业生产中的问题。例如，年产 10g 合格的干扰素，其产值高达 1 亿元，这是一个不小的产值，但不一定要用工业色谱，若用制备，甚至中等规模制备色谱就足够了。本文着眼于生产方面，故仅阐述与后 3 种色谱有关的内容。

第一节　基本理论

与分析色谱相比，制备色谱有其独特之处。前者希望进样量愈小愈好，检测灵敏度愈高愈佳，因此，出现了当今的微型毛细管柱色谱。而后者则要求进样量愈大愈好，使得在色谱柱大小一定的条件下，可分离和纯化较多的目标产品。另外，与小分子物质的分离相比，生物大分子的色谱分离又有不同之处。一个鲜为人知的事例是前者的分离好坏与柱子的理论塔板数有关，而理论板数则对后者的分离效果并无显著的影响。这反映小分子与大分子的保留机理是有差别的。

用液相色谱分离和纯化蛋白质是在液-固界面上进行的，因此，首先应了解的是蛋白质在液-固两相间的分配和在固定相表面上的吸附等温线。

当液相中蛋白浓度很低时，在液-固两相间蛋白分子分配达到分配平衡时，在流动相中蛋白平衡浓度很低。这时溶质的分配系数可近似地看作是一个常数，即在固定相上吸附的蛋白浓度与流动相中的浓度成正比。相反地，如果液相中蛋白质浓度很高，蛋白在两相间的分配系数可能不再接近一个常数，而是流动相中蛋白浓度的函数。如果用物理化学中吸附等温线来表示，则在众多的吸附等温线中[1]，Langmuir 型吸附等温线常用来描述前者；而 Freundlich 型吸附等温线常被认为是描述后者几种公式中的一个经验公式。但是，因 Freundlich 型吸附等温线不能从理论上推导出来，式中各项的物理意义亦不清楚，使其应用受到限制。一个新近的研究结果表明，依据溶质、溶剂和吸附剂三者之间的各种相互作用的 5 个热力学平衡所推导出来的液-固体系中的溶质计量置换吸附模型[6]是比 Langmuir 模型为佳的一个理论模型。它的核心是：当一个溶质分子被吸附剂吸附时，在溶质分子和吸附剂接触表面之间必然会释放出一定计量数目的溶剂分子。而且，该模型又能从理论上推导出 Freundlich 公式[7]，并可表示为：

$$\lg P\bar{L}_nD_{(m-q)}=\beta-(n/Z)\lg[PD_m] \tag{7—1}$$

(7—1) 式中 $[P\bar{L}_nD_{(m-q)}]$ 表示在吸附剂表面上溶质的浓度 (m mol/m^2)，它是以溶剂 (D) -溶质 (P) -吸附剂 ($\bar{L}$) 的“三元络合物”形式存在的；$[PD_m]$ 为溶剂化溶质在溶液中的平衡浓度 (mol/L)；Z 为当 1mol 吸附剂溶质被吸附时，在溶质分子与吸附剂的接触表面处释放出溶剂分子的摩尔数；n 为在此计量置换过程中从吸附剂表面所释放溶剂分子的摩尔数 (永远大于 0)[7]，而且，

$$Z=n+q \tag{7—2}$$

(7—2) 式中的 q 为在此计量置换过程中从溶质分子表面释放出的摩尔数 (永远大于 0)；(7—1) 式中的 β 为一常数，它包括了计量置换平衡常数 K_a 和溶质在液-固两相间的分配系数 P'_a。

$$\beta=\lg K_a+n\lg P_a' \tag{7—3}$$

因为 (7—1) 式中的 β、n 和 q 均为常数，所以 (7—1) 式为线性方程，它的数学表达式与 Freundlich 公式完全相同。然而，如上所述，(7—1) 式中的各项物理意义清楚，而且，如 (7—2) 式所示，n 永远是 Z 的一个分数，所以能解释 Freundlich 线性作图时其斜率小于 1 的原因。上述讨论说明了 Freundlich 公式只是计量置换吸附模型的一个特殊表达式，这就为非线性色谱理论奠定了牢固的热力学基础。

非线性色谱动力学描述了在柱过载的条件下(即溶质在液-固两相的分配系数不再是线型的)色谱带的扩展方式不再是高斯型的。这样形成的非对称色谱峰随着迁移次数的增加如何改变形状，确是一个十分复杂的理论问题。此外，吸附等温线形状变化与峰形的关系亦是非线性色谱动力学研究的重要内容之一，已有专文介绍[8]。尽管非线性色谱理论要解决的问题是如此的重要，但是，因许多微分方程的难以求得解析解和到目前为止的有关研究条件过份简单，所以离其解决制备或生产色谱条件最优化等这一类实际问题，尚有很大的距离。

虽然，在各类色谱中小分子的保留机理有许多不同的观点和模型[9]，但对生物大分子在各类色谱柱中的保留机理却研究得不多。这是因为，这些众多的模型中，基本上都是从计算分子间相互作用力出发的，这对于非线性小分子溶质而言，还能解决一些实际问题。但对大一些的极性分子就会遇到计算不准确的困难，对于分子量是几万乃至百万道尔顿的生物大分子来讲，要作这种计算则是望尘莫及了。对某些类型的色谱来讲，例如，离子交换色谱，对于大分子与小分子的保留机理基本相同这一点是无可争议的。但是，对另外一些色谱，如反相高效液相色谱情况则不同。有人认为大分子与小分子溶质的保留可能存在着相同的机理，在反相色谱中溶质可能存在着在流动相与吸附在固定相表面的吸附层中的液相之间进行分配[10]。这也是 Martin 和 Synge 提出分配色谱的理论基础[11]，他们俩人也因此荣获 1952 年的化学诺贝尔奖。另外一些人认为，很难使人相信这种机理适用于生物大分子。因为依据表面物理化学的论点[12]，在吸附剂表面上的吸附层可能是单分子，一个分子量高达数万甚至几十万道尔顿的生物大分子怎么会在分子量小于一百道尔顿的单分子层溶剂和流动相之间进行相分配呢？即便是多分子层，例如，有十层、甚至上百层，亦难完全达到将生物大分子完全浸没在其中的这一要求。这样就排除了生物大分子在反相色谱中存在着分配机理的可能性。这一例子再次说明不能简单地将小分子在色谱柱上的保留机理用于生物大分子。况且，传统的观点认为，不同种类色谱有不同的保留模型，而且每一类色谱中提出的不同保留机理又是如此之多，以致在此无法选出其中的某些典型来进行介绍。这里仅介绍一种新的、可适用于除尺寸排阻色谱外的各类液相色谱的统一的保留机理——溶质计量置换保留模型(stoichiometric displacement model of retention，简写为 SDM -R)[6]。基于在色谱体系中溶质、流动相和固定相分子间的相互作用，和用与 (7—1) 式相同的 5 个热力学平衡推导出来的液相色谱中的 SDM -R 的总过程可用图 7-1 来表示。

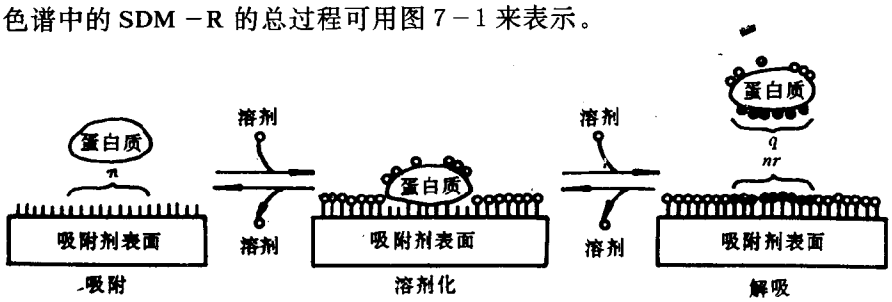


图 7-1　蛋白质的吸附-解析示意图

该保留模型的简化数学表达式为：

$$\lg k' = \lg I - Z\lg [D] \qquad (7—4)$$

式中，k'为溶质的容量因子；[D] 为流动相中置换剂的摩尔浓度；Z 的物理意义同前。$\lg I$ 包

括一组常数，它与溶质分子对固定相亲和势大小有关，并可表示为：

$$\lg I = \lg K_a + n\lg [\mathrm{Ld}] + \lg\varphi \qquad (7—5)$$

[Ld]为在固定相表面的平均活性点与置换剂相互作用的平衡浓度，m mol/m^2；φ为柱的相比，是一个与柱和流动相性质有关的无量纲常数；式中的K_a与n的物理意义与（7—1）式～（7—3）式中所述的完全相同。

当（7—4）式中的[D]变化范围不大时，（7—5）式中的[Ld]可视其为常数，于是$\lg I$就成了一个常数项。（7—5）式中的n和q也是一个不随[D]变化的常数，于是（7—4）式中的$\lg I$和Z均为常数，所以（7—4）式就成了一个线性方程式，如果以$\lg k'$对$\lg$[D]作图，便能得到一条斜率为Z、截距为$\lg I$的直线。

如果考虑到流动相中弱溶剂与强溶剂间在固定相上的竞争吸附的第6个热力学平衡，并且允许[D]的变化范围很大时，则能得到适用于全浓度范围的多组分SDM－R的数学表达式[13,14]。因该表达式无准确的解析解，依其某些假定、简化和数学变换的不同，可简化成许多不同的简化式。例如：

全浓度二元体系中的SDM－R表达式可表示为：

$$\ln k' = \ln I_{nn} - n\ln\left(1+\alpha [\mathrm{D_a}]_m\right) - q\ln [\mathrm{D_{am}}] \qquad (7—6)$$

全浓度三元体系中的SDM－R的数学表达式可写成：

$$\ln k' = \ln I'cc - n_1\ln\left(1+\alpha_1 [\mathrm{D_{(1,m)}}]\right) - n_2\ln\left(1+\alpha_1 [\mathrm{D_{(1,m)}}]\,\alpha_2 [\mathrm{D_{(2,m)}}]\right) - q_1\ln [\mathrm{D_{(1,m)}}] - q_2\ln [\mathrm{D_{(2,m)}}] \qquad (7—7)$$

（7—6）式与（7—7）式中的$\ln I'cc$、n、q、n_1、n_2、q_1、q_2、α、α_1、α_2均为常数；[D]、[$\mathrm{D_{(1,m)}}$]为强置换剂的摩尔分数；[$\mathrm{D_{(2,m)}}$]为次强置换剂的摩尔分数。其各常数的物理意义请参阅有关文献[13～15]。

从（7—6）式和（7—7）式还可以简化出目前在各种液相色谱（除尺寸排阻色谱）的许多公式，（7—4）式便是其中的一种。

上述的SDM－R不仅有其牢固的物理化学基础[7]，而且经实验检验可适用于反相色谱中的生物大分子[6,16]和小分子[17]、离子交换[18]、正相色谱[19]、薄层和纸色层[20]、亲和色谱[21]和疏水相互作用色谱[22]。此外，更重要的是用计量置换这一概念和相同的热力学平衡，将多年来物理化学家和色谱学家各自独立进行研究的液-固吸附机理及溶质在液相色谱中的保留机理统一起来。L. R. Snyder[23]曾用该模型推导出了30余种白细胞介素－2突变蛋白在反相高效液相色谱过程中的分子构象变化。此外，还为用疏水色谱对变性蛋白进行复性和折叠机理研究奠定了分子力学基础[24,25]。

第二节　装置和操作技术

无论是用什么类型（液相或气相）、用于什么目的的色谱，其装置均包括流动相供给、进样、色谱柱和检测器4大部分。只是因色谱种类和用途的不同才会再附加一些其它的装置，例如制备型或工业型高效液相色谱。在流动相供给部分还包括了贮液罐、高压泵、液体混合室及梯度洗脱系统。因进样体积大，所以进样器附一输液泵。为保护昂贵的色谱柱，在色谱柱前还加有预柱。在检测系统中附一积分仪或记录仪，并且有流份收集器以收集目标产品。当

然，在工业生产中，亦有用开口色谱柱的，人工控制加样和加流动相以及人工控制流速、人工收集流份的最原始的操作方式。但是，后者由于色谱过程冗长，常常使蛋白生物活性降低，不宜用来分离和纯化昂贵的生物工程产品。在基因工程生产的治疗蛋白分离和纯化中，多数情况下是用自动化程度很高的制备型高效液相色谱仪。Waters Delta Prep 3000 制备型高效液相色谱仪便是众多的这种类型的仪器中的一种。它可安装直径 5cm 的不锈钢色谱柱，并且液体流速可高达 160ml/min。

制备柱的内径可在 2～5cm 之间，因此通常分析柱头上的单孔式进样将会产生严重的“柱壁效应”。为弥补这种缺陷，在柱头上安装了试样分流器，又叫径向加压器，以使试样在柱顶端尽可能地在水平方向上均匀地分布并使其随流动相从柱顶端均匀向下流动。这样，在色谱分离过程中才能形成相互分开的敏锐的色谱带。

在色谱过程中，有两种将目标产品从色谱柱洗脱的方法，一种是维持流动相热力学参数不变的等度洗脱法；另一种是改变其中一种或几种热力学参数的梯度洗脱法[10]。前者所指的是维持流动相的温度、浓度和 pH 值等参数不变。在多数情况下这种洗脱方式仅适用于小分子溶质的分离和纯化。对生物大分子而言，往往是采用后者的梯度洗脱。最常用的是浓度梯度，即增大流动相中某种组分（从前述的计量置换保留模型中称之为置换剂）的浓度使溶质从柱上洗脱。有时亦会改变流动相的 pH 值，这实质上亦属浓度梯度洗脱中的一种，只不过所改变的组分为氢离子而已，人们习惯上把它叫做 pH 梯度。多数情况下是用单纯的浓度梯度或 pH 梯度洗脱，在离子交换色谱中情况就是这样。也有在个别的情况下同时改变 pH 值和盐浓度的，如在亲和色谱中，在重组人 α-干扰素单克隆抗体柱上洗脱重组人 α-干扰素。梯度洗脱方式有两种，一种是突然改变流动相组成到一定浓度的脉冲式（或不连续梯度）洗脱，这种洗脱毋须用复杂的仪器，只须在强、弱两种溶剂通往单泵进液口处装一液体流路转换阀即可。另一种是连续改变流动相中某种组分浓度的连续式梯度，包括线性的和非线性梯度。后者必须使用梯度洗脱装置和液体混合器。在现代分析型液相色谱中基本上都带有梯度洗脱装置。但是，在制备型高效液相色谱中情况却不相同。有许多种专门只供等浓度洗脱的制备型液相色谱仪，在订购仪器时，须充分地注意到这一点。

第三节　色谱条件及色谱纯化工艺的最优化

这是一项涉及学科面广、与色谱和现代分离科学乃至基础理论密切相关的一门复杂的学问。一些训练有素的色谱工作者可以在短时间内提出一个既节省资金又有好的色谱分离结果的方案；而另一些人用同样的仪器和色谱柱，可能会花费很长的时间才能设计出一个分离方案，而且，在许多情况下，分离和纯化效果较差，或者根本达不到分离和纯化的效果。

从图 7－2 所示的一般蛋白分离和纯化的流程图中看出，色谱属精细分离和纯化工序之列。除了在图中最后的浓缩工序为除去色谱洗脱液和除盐外，在流程中有时还有一蛋白复性工序。由于前述的新近全色谱分离纯化工艺的发展，用色谱方法来解决预分离和复性便成为色谱工作者当今快速分离和纯化及降低治疗或诊断蛋白成本的一个热门研究课题。

单纯从每一步和色谱分离最优化条件来讲，它涉及到固定相（包括种类、颗粒大小）、流动相、柱尺寸、流速、洗脱方式、质量回收率和活性回收率等每一参数的最佳选择。接着便是将这些参数综合在一起的色谱条件最优化研究。最后，便是将各步分离纯化串在一起组成

一个完整的蛋白纯化工艺。有时甚至连同发酵工艺一起进行生产工艺的优化选择。这时，要以经济效益为核心。这里要特别指出的是前工序的发酵工艺对后工序的纯化工艺的影响之大有时是令人吃惊的，例如：Amgen 公司的专家发现如果在白细胞介素－2（IL－2）的发酵过程中，用正亮氨酸代替产物中的蛋氨酸，可使产物发生不可预计的免疫遗失，从而得到的是不均一性的产品。如在发酵介质中加入低浓度的异亮氨酸或蛋氨酸，这种掺合作用可以去除。

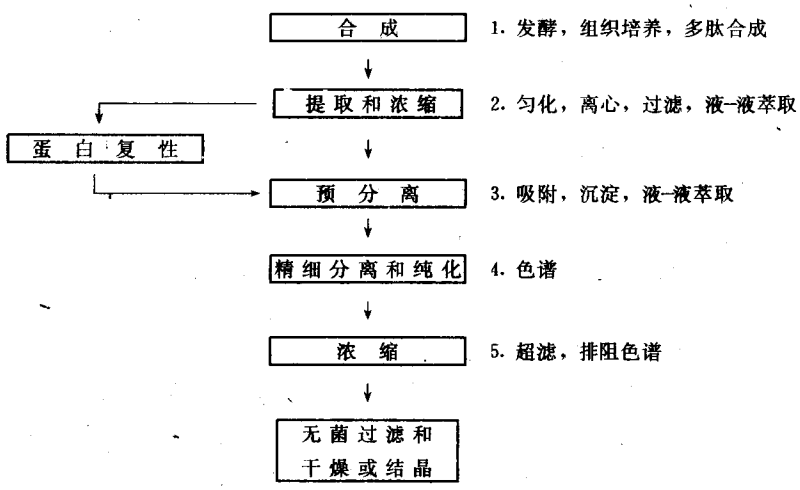


图 7－2　蛋白质工业化分离纯化流程图

色谱单元纯化条件的最优化首先是要对所用色谱柱的种类进行选择，这取决于试样和目标产物的性质。一般来说，期望目标产品尽可能多的保留，而杂蛋白不保留，因此需选择目标产品与固定相作用力强、廉价的色谱柱。表 7－1 列出了各类色谱中溶质与固定相间的相互作用力的性质，除了亲和色谱为一种蛋白或一类蛋白分离纯化专用而称之为专用型色谱外，其它各类色谱可以对许多蛋白进行分离，因此称为通用型色谱。

表 7－1　各类色谱中溶质与固定相间的相互作用力

色谱种类	相互作用力类型	特　点
离子交换色谱	电荷力	通用型
正相色谱	氢键、定向力（或选择性作用力）	通用型
反相色谱	非选择性作用力或伦敦力	通用型
疏水色谱	疏水相互作用力及非选择性作用力	通用型
尺寸排阻色谱①		通用型
亲和色谱	选择性的生物作用力	专用或基团性通用型

①分离是依据溶质分子的大小，严格说来溶质分子不应与固定相产生相互作用力。

如前所述，选择色谱类型是最重要的也是涉及知识面最广的难题。它需要有分离科学中的分子力学基础。当填料选定后，就要选填料颗粒、孔径及柱尺寸的大小。色谱柱选定后，要选择合适的流动相。通用型色谱流动相选择的一般原则将在本文介绍各种色谱方法的应用时

加以叙述。流动相组成、流速和梯度洗脱方式对获得好的分离效果、高的质量和高的活性回收率等起着至关重要的作用。到目前为止，虽有一些规律可循，但主要还得用实验方法来选择。一旦选定了几种不同色谱的最优化条件，接着便是如何由这些单元来组合成最佳分离和纯化工艺了。就分离纯化体系的本身来讲，表 7－1 中所述的一种性质的作用力的色谱一般只用一次。例如，已经用过了阳离子交换柱分离，在以后的分离中就不再考虑用阴离子交换柱了，因为两者均是依据在一定 pH 值条件下目标产品与杂蛋白与固定相的电荷作用力大小不同进行相互分离的。当然，重复使用同一类色谱柱亦可能改善分离效果，但从质量和活性回收率、试剂、仪器及时间消耗等优化方案来评价，不如换用表 7－1 所示的其它类型的色谱柱（如疏水或亲和色谱）为佳。在满足产品质量前提的条件下，如上所述，最优化工艺的核心是经济效益，而不再是上述的质量或活性回收率、纯度等。因此，工业生产过程最优化的概念已远超出了分离和纯化的本身，必须与生产成本联系在一起，它是由产品质量和经济效益这两方面的因素来决定的。将每步单元操作的最佳条件简单地串联起来并不一定能成为一个最佳的分离工艺。例如，欲分离某种蛋白质，首先将经硫酸铵沉淀分离后含目标产品的浓盐溶液用阴离子交换柱在 pH7 条件下进行分离。显然不可将此浓盐溶液直接加到交换柱上，否则目标产品不会保留在柱上，只有在除盐或将其用水稀释后方可进行阴离子交换分离，用盐梯度洗脱。若在其收集液中盐的浓度为 0.4mol/L 时分离效果最佳，接着再用疏水色谱纯化。而后者的洗脱条件也为 pH7.0，流出液浓度为 0.7mol/L 的盐溶液。显然，在经离子交换色谱分离后的洗脱液必须加盐，使其浓度达到较高的浓度，例如，1.5mol/L，才可将其加到疏水相互作用色谱（HIC）柱上，这样就很不方便。如果先用 HIC 柱分离，将接收液用水简单稀释或用膜过滤使盐浓度降低，例如盐浓度只有 0.1mol/L，这时可进含低浓度盐试样到离子交换柱。后者的排列方法显然较前者为优。

关于成本和分离条件的选择问题可用以下公式来计算之[26]。

$$E=P/t$$

式中，E 为经济效益；P 为利润；t 为一次分离和纯化所需的时间。

$$P=V_P-V_o-C$$

式中，$V_P=\gamma_p m_p$；$V_o=\gamma_o m_o$；$C=cm_P$。γ_p 为产值；m_p、m_o 分别为产品的质量和进样混合物的质量；γ_p、γ_o 和 c 分别为产品和进样混合物的比价以及生产单位重量产品所消耗的成本。

所以，经济效益 E 为：

$$E=T_p\ (V_p-c)\ -\gamma_o m_o/t$$

式中的 T_p 为产量：

$$T_p=m_p/t$$

用另外一种方法来表示为：

$$T_p=\left[m_o-m_o\ (1-P_o)\ r-m_o P_\infty\ (1-y)\right]/t$$

式中，$P_o=m_m/m_o$=原料纯度；m_m 为在原料中蛋白的质量；r 为除去的杂质质量/杂质总量；y 为目的产品的得率。

当然，亦可对产品价格和柱价格、溶剂价格、仪器耗损、维修费和劳动力价值逐步进行分析，详见有关文献[26]。

第四节　应用举例

第二次世界大战期间，美国的“曼哈顿”工程（Manhattan Project）用离子交换色谱法纯化了公斤级稀土元素[27]；50年代初期已实现了用硅胶吸附分离芳烃及烷烃的生产过程（Arosorb Process）[28]，这些都是大规模连续的液相色谱生产过程。之后，出现了大规模的尺寸排阻色谱（SEC）用于工业生产分离[29,30]，1956年又出现了大规模的气-液色谱的工业生产规模[31]。

尺寸排阻色谱在工业生产的分离、纯化聚合物和蛋白质中用得很多。据对1982年出版的生物化学杂志（Journal of Biological Chemistry）发表的所有纯化蛋白的色谱柱进行统计，其中60%的色谱纯化体系至少有一步是用SEC柱。理想的SEC是利用产品的分子大小不同进行分离的，它应当与流动相组成无关。事实上，当流动相中盐浓度很低和pH值发生改变时，SEC会呈现出离子交换的性质。在SEC中所用的色谱介质仍然有软和硬基质之分，其中比较有名的是瑞典的Sepharose系列和日本的TSK系列柱。这种方法的缺点是分离效果差和进样体积受到限制，而且需一系列柱配套才可对分子量大小不同的产品进行分离。这类色谱虽然成本相对较高且分离效果较差，但因操作简便且可用于除盐，故容易推广和使用。乳酸同功酶的纯化就是一例[32]。

疏水相互作用色谱（HIC）因其廉价和纯化后的蛋白具有生物活性而成为一种较新的发展前途广阔的专门用于分离生物大分子的色谱方法[33]，并且是一种通用型的分离和纯化蛋白的工具。具有三维或四维结构的生物大分子被具有高疏水性的盐水溶液（流动相）推向具有适当疏水性的固定相。蛋白分子表面上的某些疏水区与固定相间以非选择性力相互作用使蛋白保留。而蛋白质分子中那些极性相对大的部分与流动相相互作用使蛋白分子洗脱。不同蛋白质的这两种相反方向作用力之差值才是蛋白实际保留的作用力，不同蛋白依其对固定相作用力大小的不同使其相互分离。因不同蛋白表面上疏水区大小和数目不同，且面向流动相的亲水基团各异，所以，在HIC上蛋白的保留与其分子量大小无关。从SDM-R的角度来讲，水是置换剂。这一重要结论为HIC成为变性蛋白的复性工具奠定了理论基础[34]。因为在高浓度盐水溶液中蛋白在HIC柱上保留，在低盐或水溶液中蛋白从HIC柱上被洗脱，所以它特别适合于用浓硫酸铵溶液沉淀分离后的母液以及该沉淀用盐溶液溶解后的含有目标产品的溶液直接进样到HIC柱。当然，它亦适用于用7mol/L盐酸胍或8mol/L脲的大肠杆菌的治疗蛋白提取液直接进样到HIC柱上，在分离纯化的同时亦进行复性，从而取得了“一举两得”的效果。rIFN-γ的纯化和复性便是一例[35]。

在HIC中应用最广泛的流动相是硫酸铵的水溶液，这是因为它的最高浓度可达3.5mol/L，它的浓度每改变1mol/L，则水的浓度改变3.4mol/L，是所有盐类中最高的。因此，它是能提供水浓度变化范围最宽的一种盐，从而可提供疏水强度变化的最宽范围[25]。

·亲和色谱是一类有30余年历史、专门用于纯化生物大分子的色谱。它是基于固定相的配基与生物大分子之间的特殊的生物亲和能力的不同来进行相互间的分离的。依据这种亲和选择性的高低，可将亲和色谱分为基团性和高选择性（有时亦称专一性）两大类。前者系指固定相上的配基对一类基团有极强的亲和力，三嗪染料对含有糖基的一类蛋白或糖蛋白显示特别强的吸附能力就是这类基团性亲和色谱柱的一个例子。后者的配基仅对某一种蛋白有特别

强的亲和性，如单克隆抗体对抗原的特异性吸附就属此类。这里要强调的是，这样分类是为了叙述方便。事实上，这两类亲和色谱之间并无明显的界限。即便是上述的将单克隆抗体键合到基质上成为单抗亲和柱，除了它对抗原的吸附外，仍然会因分子的错误认别和分子间的非选择性作用力而吸附一些杂蛋白。将染料、外原凝激素及单克隆抗体、多克隆抗体以及其它蛋白、酶、糖等生物大分子等有关配体如何键合到基质上以合成亲和色谱固定相的方法，在有关专著及评述性文章中已有详细描述[36]。由于在色谱洗脱过程中的配体不可避免地脱落，特别是在用软基质的填料时这种情况尤为严重，使得对人体有严重危害的某些配基（如染料、单克隆或多克隆抗体）从柱上脱落而进入分离体系，所以，用这种方法纯化的治疗蛋白不经特别处理是不可以直接注射或服用的。加之，后者的价值相当昂贵，使其在分离和纯化生物大分子的生产工艺中的应用受到限制。

将过渡金属离子Cu^{2+}、Zn^{2+}和Ni^{2+}等以亚胺金属络合物的形式键合到固定相上，由于这些金属离子与组氨酸和半胱氨酸之间形成了配价键，从而形成了亚胺金属-蛋白螯合物，使含有这些氨基酸的蛋白被这种金属螯合亲和色谱（MAC）的固定相吸附。由于这种螯合物的稳定常数是受单个组氨酸或半胱氨酸解离常数所控制，从而亦受流动相的 pH 值和温度的影响，控制后者的条件便可使不同蛋白相互分离。如果某种蛋白不含有这两种氨基酸，则可采用将含有这两种氨基酸中的一种或两种的多肽接到欲纯化的蛋白质分子上，形成含有该多肽的蛋白，再将其用上述方法纯化。最后，用酶或化学方法将该引伸的多肽链切除并与目标蛋白分离，从而将目标蛋白纯化。这种色谱又称之为螯合肽固定金属离子亲和色谱（Chelating－Peptide Immubilized Metal－ion Affinity Chromatography，简称 CP－IMAC）[37]。由于该法价廉，且不易给分离体系带来对人体有严重危害的杂质，最近的应用逐渐增多[4]。

离子交换色谱（IEC）由于价廉和纯化后的蛋白多保持原有活性，是另一种在生物大分子分离和纯化中应用广泛的通用型色谱。离子交换色谱作为一种分离技术的原理是众所周知的电荷之间的选择性相互作用力。其应用于蛋白质的分离又有一些新的特点。这就是蛋白质有不同的等电点，所以可用调节 pH 值的方法使一些蛋白带正电荷，而使另外一些蛋白带负电荷，剩余的蛋白呈中性或接近中性，从而可选择阳离子（强阳或弱阳型）或阴离子（强阴或弱阴型）离子交换剂作为固定相以进行蛋白质的相互分离。在离子交换色谱中所用的流动相为盐的水溶液。依据 pH 值和盐浓度的变化与使用固定相的种类，可用 pH 值或盐浓度梯度或等浓度洗脱，除蛋白的活性部位处于可解离性基团上，用 IEC 分离时可能失活外，在绝大多数情况下，以 IEC 法进行分离和纯化的蛋白均保持原有的活性。

在离子交换中，蛋白在交换剂上的吸附要置换出在交换剂上的配衡离子，使流动相中的H^+离子浓度增大或减小，从而会影响蛋白的电荷大小和它在固定相同流动相之间的分配平衡。为维持流动相中 pH 值恒定，应用缓冲溶液。一般推荐的适合的缓冲容量应为交换 10m mol/L，在这种缓冲溶液中能维持溶液中酸度在弱酸电离常数负对数 pK 的±0. 3pH 以内[3]。在离子交换中一般常用的缓冲液列于表 7－2。

还要注意缓冲液不应干扰蛋白的交换过程，并要注意温度对 pK 值的影响，以避免因此影响蛋白的分离和纯化。

反相液相色谱（简称 RPLC）是一种通用型的分析、分离和纯化色谱方法[9,38]。它是利用溶质分子中非极性基团与非极性固定相间相互作用力（非选择性分散力或伦敦力）大小与溶质分子极性基团与流动相中极性分子在相反方向上相互作用力大小的差异进行分离的。对于

小分子溶质而言，它是一种分离效果最好、应用范围最广的方法。然而，因其流动相中的置换剂是极性小于水的有机溶剂（如甲醇、乙腈、四氢呋喃等），这些有机溶剂可能使许多蛋白分子产生不可逆的变性；流动相中须有离子对试剂（如三氟醋酸、甲酸、磷酸等）存在才可使分离有效的进行和获得高的质量回收率；分离须在酸性介质中进行（一般 pH 值在 2～3 之间），所以又有一些蛋白会在这后两种条件下产生不可逆的分子构象变化。所有这些使蛋白分子产生不可逆变化的条件，都使 RPLC 在生物大分子的分离和纯化中受到限制。然而，有些天然蛋白或重组蛋白，如重组人胰岛素和白细胞介素-2（IL-2）等在上述条件下的分子构象变化是可逆的，即在除去变性剂后又可以恢复到原有的活性，又叫复性。因此 RPLC 便成为这一类蛋白的有效分离和纯化方法。图 7-3 所示的用 RPLC 分离纯化重组人胰岛素便是一例[39]。

表 7-2　在离子交换色谱纯化蛋白质时常用的缓冲液

交换剂	缓冲液	pK	缓冲范围
阳离子型	醋酸	4.76	4.8～5.2
	柠檬酸	4.76	4.2～5.2
	2-（N-吗啉代）乙磺酸	6.15	5.5～6.7
	磷酸	7.20	6.7～7.6
	N-2-羟基乙哌嗪-N'-2-乙磺酸	7.55	7.6～8.2
阴离子型	L-组氨酸	6.15	5.5～6.0
	嘧唑	7.0	6.6～7.1
	三乙醇胺	7.77	7.3～7.7
	Tris	8.16	7.5～8.0
	二乙基胺	8.8	8.4～8.8

在 RPLC 分离体系中，固定相一般对分离效果影响不大。最重要的是对流动相组成和洗脱方式的选择。在 RPLC 中常用于分离生物大分子的流动相有 3 种体系：有机溶剂（甲醇、正丙醇、异丙醇、乙腈）-三氟醋酸（浓度一般在 0.1%～0.3%，v/v）-水体系；上述的有机溶剂-0.05mol/L 磷酸盐缓冲液（pH2～3）-水体系；上述的有机溶剂-甲酸（40%～50%，v/v）-水体系。第一种用途最广。其原因是三氟醋酸起到了离子对试剂和控制流动相 pH 值的双重作用。从新近研究得知，它还参与了对蛋白分子的计量置换过程[40]，而且流动相中的所有组成均是可挥发的，将收集液冻干便能得到不含任何盐分的纯蛋白固体。第二类体系中的磷酸盐常常会因操作的不慎，当其偶然地与高浓度有机溶剂相遇时会形成沉淀，堵塞色谱柱和检测器，甚至不锈钢导管，所以在实际中很少用。第 3 类体系中的甲酸虽亦起着与三氟醋酸相同的双重作用，但高浓度甲酸对蛋白立体结构的破坏程度较有机溶剂大得多，又因其对人体的毒害及对皮肤的损害常使操作者望而生畏。但是，对于那些难溶的蛋白，如某些膜蛋白的分离和纯化，却是一种其它流动相不可替代的有效流动相。

图 7-3 列出了分离和纯化重组人胰岛素的工艺路线中用第一类流动相体系作为其中的一步纯化。

正相色谱在生物大分子的分离和纯化中应用相对较少，因为所用溶剂体系很贵，但在一些场合中也有其特色。

新近发展起来的径向流亲和色谱（Radial-flow Affinity Chromatography，简称 RFAC）

是一种不用复杂仪器的快速纯化蛋白方法；它可以将亲和色谱中所用配基键合到膜上，在流动相经过膜时将蛋白质吸附，更换流动相可将其洗脱，这种方法已有文献介绍，并用于胰蛋白酶的生产规模纯化[41]。

新近发展的超临界色谱（SFC）其流动相为超临界流体（如 CO_2，价廉），而且易用减压使其与基因或生物化工产品分离，还可加入少量极性溶剂（如甲醇）以进行梯度洗脱。在 1985 年已有第一个超临界制备色谱的报告[42]。最近又发现用 SFC 分离氨基酸较液相色谱方便很多[43]。

还值得一提的是，最近提出的用 HPLC 分离生物大分子的一种新技术——灌注色谱法[44]。该法是用孔径达 600～800nm 的颗粒填充柱子，使流动相从其孔中流过以实现色谱分离过程。由于有很多 50～150nm 的小孔相互组成的网状物连结在这些大孔的内部，从而使其与蛋白分子的接触表面积大大增加。扫描电镜显示出在基质的大孔内的网状结构是连续的，且大孔直径均在 500～1000nm 之间。当蛋白质进入孔中后，其扩散路径缩短，所以此大孔填料可达到色谱填料颗粒直径非常小的色谱柱效能，且柱压降只是后者的分数。从电镜、柱效、柱前分析得出的数据以及动力学模型推导均证实流动相将流过这些大孔。在这种方式下，蛋白质分子通过对流和扩散的双重作用进入颗粒内部。文献报告了对峰的扩散、分离效果及动力学容量等均进行了检验。所以在增加流动相线速高达每小时几千厘米的情况下，其对蛋白质分子的峰形扩散和分离情况以及柱的动力学容量均无影响。总之，该法可减小流动相传质阻力而不牺牲高的吸附容量，且不需要在特别高的压力下操作。

表 7－3 列出了某些基因工程产品分离和纯化的典型事例。

前已叙述无论用什么技术对治疗或诊断蛋白的分离和纯化均应具有原有蛋白的生物活性。对某些蛋白而言，正如图 7－2 所示的，在第 2 到第 3 工序之间有一复性工序。通常的复性方法为透析法或用溶剂稀释法。因其费时长，且不能将变性剂（盐酸胍或脲）完全除去，因而复性常常是不完全的。此外，稀释法有时要将其稀释 200 倍[45～50]，这不仅给后工序的操作带来很大困难，而且提高了生产成本。关于这方面的研究最近已有评述[51]。因此，这不仅是一个目前国际上急待解决的热门研究课题，而且也是涉及到在生物工程生产中降低基因工程产品成本和能带来巨大经济效益的一个重要技术难题。

最近作者用 HPHIC 方法将用 7mol/L GuHCl 溶液从大肠杆菌中提取的重组人干扰素-Gamma（rIFN－γ）直接进样到 HPHIC 柱上，用梯度洗脱法在 40min 内不仅将已变性的 rIFN－γ 完全复性，而且可除去绝大部分的杂蛋白，从而使 rIFN.－γ 的纯度达到 85%。这一步操作可同时进行蛋白复性和纯化的双重目的，从而大大简化了 rIFN －γ 的纯化工艺[35]。本法亦适用于胍变性的 4 种标准蛋白的复性，除淀粉酶外，在 30min 内复性接近完全。用 HPHIC 法使蛋白折叠和复性的原理是，它在完全除去变性剂的同时，使水合的变性的蛋白分子在被水合 HPHIC 固定相表面吸附的同时，将变性蛋白分子表面上的水合水分子“挤出去”，并从疏水表面获得能量。在变性蛋白分子中的疏水氨基酸残基集中处进行局部折叠以形成微结构，当其返回到一个改变组成的流动相（疏水强度、离子强度和粘度等）中时，该微结构会“成长”，并在无数次的吸附-解吸附过程中，成长-修正错误构象-再成长，所以这种固定相、流动相两者的本身以及上述的协同过程又促使再折叠过程的加快，这从热力学和动力学两方面均为蛋白复性创造了条件，实现了变性蛋白分子的人工折叠过程[51]。

trpLE′−MET −Proinsulin

↓CNBR 限制内切酶

胰岛素原（Proinsulin）

↓氧化

Proinsulin $(ss_{O_2})_6$

↓纯化及折叠

粗胰岛素原

↓纯化

纯胰岛素原

↓酶促转化

粗胰岛素

↓阴离子交换（除一部分杂蛋白）

反相−HPLC

[10−umzorbax Process Grade C_8（15×0.94cmI，D,），进样 BHI 153mg，梯度洗脱 17%～29%乙腈（在 0.24mol/L 醋酸中），流速 0.3ml/min]

↓排阻色谱（除去反相 HPLC 中的洗脱液及少量杂蛋白并浓缩）

纯胰岛素浓集液

↓结晶过程

纯胰岛素晶体

图 7−3　胰岛素原法合成胰岛素过程及纯化

随着生命科学的发展，基因工程生产的蛋白质药物将会逐渐地代替化学药物。发酵工业和食品工业的发展对生物化工和基因工程的发展也将会有很大的促进。这样，对于生物产品分离及纯化极为有效的制备型色谱，一定会有迅速的发展。首先是要合成价廉的色谱填料，包括通用型的色谱填料和高选择性的填料，这是降低生物化工和生物工程产品成本和提高产品纯度的重要方面。当然，生产出廉价的色谱设备亦是今后努力的方向之一。研究色谱分离和整个纯化工艺的最优化是色谱用于生产的核心。只有在这方面取得了突破性进展后，才能将基因工程产品的生产成本大大降低和创造高的经济效益。相信色谱分离技术会在生物工程中得到愈来愈多的应用。

表 7−3　某些生物大分子色谱分离和纯化的典型例子

名　称	来　源	色谱种类	文　献
IFN−β	成纤维细胞基因工程	RPLC	52
β−半乳糖苷酶		IEC（阴） 灌注色谱	53 65
胰蛋白酶		径向流亲和色谱	4
IFN	不同来源	IAC	54～56
IL−2			57
血液凝聚因子			58
膜抗原			59
IL−2 受体			60
LHRH［促黄体（激）素释放激素］		CP−IMAC（螯合肽−固定金属离子亲和色谱）	61

（续表）

名　称	来　源	色谱种类	文　献
HCG	孕尿	IEC（阴）	62
glcophorins A. B. C.		IMAC	63
lymphocyto 膜受体		AFC	64
重组人白介素-2		径向离子交换色谱	66
人登革病毒单克隆抗体		径向离子交换色谱	66
重组 A 蛋白	基因工程	径向离子交换＋疏水色谱	66
辅酶 Q_{10}		反相 HPLC	67
重组人干扰素-γ	基因工程	高效疏水色谱	35
核糖体蛋白	大肠杆菌中	高效离子交换或高效排阻色谱	68
重组人胰岛素（BHI）	基因工程	反相 HPLC	39
谷胱甘肽硫转酶	人胎盘	反相 HPLC	69，70
α-巨球蛋白	猪血浆	染料亲和色谱、锌螯合亲和色谱	71
α-淀粉酶	工业粗酶	高效亲和色谱	72
α-干扰素	基因工程	高效亲和色谱	73

参考文献

1 耿信笃著，现代分离科学理论导引，西北大学出版社，1990

2 P. J. Elving, E. Grushka and I. M. Kolthoff, Treatise on Analytical Chemistry, Part I. Theory and Practice. 2nd Ed. Vol5. John and Sons. New York

3 F. E. Regnier, " High Performance Liquid Chromatography of Biopolymers" 1991. 1

4 Ladisch, M. S., Wilson, R. C., Painton, C. C. and Builder, S. E., Protein Purification From Molecular Mechanisms to Large－scale Processes, ACS Symposium Series 427, American Chemical Society, Washington, DC 1990

5 K. Jones, Chromatographia, 25 (6) (1988) 547

6 Xindu Geng and Fred E. Regnier, J. Chromatogr., 296 (1984) 15

7 耿信笃，时亚丽，中国科学（B 辑），1988 (6) 571

8 J. L. Wade, A. F. Bergolde and P. W. Carr, Anal Chem., 59 (1989) 1286

9 A. M. Krustulovic and P. R. Brown, " Reverse－phase High－Performance Liquid Chromatography", John Wiley & Sons, New York, 1982

10 L. R. Snyder and J. J. Kirkland, " Introduction to Modern Liquid Chromatography" 2nd Ed., John & Sons Inc., 1979

11 A. J. P. Martin and L. M. Synge, Biochem. J. 35 (1941) 1358

12 A. W. Adamson, " Physical Chemistry of Surface" 4th Ed, John Wiley & Sons, New York, 1982

13 Xindu Geng and Liujiao Bian, Chinese Chemical Letter, 1 (1990) 135

14 Liujao Bian and Xindu Geng, Proc. 3rd Beijing Conf and Exhib on Instrum. Analysis, D69, 1989

15 耿信笃，边六交，中国科学（B 辑），1991 (9)，915

16 Xindu Geng and Fred E. Regnier, Proc. Am. Soc. Pept. Chem., 1984, 727

17 Xindu Geng and Fred E. Regnier, J. Chromatogr., 332 (1985) 147

18 L. A. Kennedy, W. Kopaciewicz, and Fred E. Regnier, J. Chromatogr., 359 (1986) 73

19 宋正华，化学学报，48 (1990) 87

20 宋正华，耿信笃，中国稀土学报，1987 (5)，65

21 D. J. Anderson and R. R. Walters, J. Chromatogr., 331 (1985) 1

22 Shiaw－Lin Wu, K. Benedek and B. L. Karger, J. Chromatogr., 359 (1983) 3

23 M. Kunitani, D. Johnson and L. R. Snyder, J. Chromatogr., 371 (1986) 313

24 耿信笃，常晓青，J. Chromatogr.，599 (1992) 185
25 常晓青，西北大学，硕士论文，1992
26 I. Mazsaroff and Fred E. Regnier, J. Liq. Chromatogr., 9 (12) (1986) 2563
27 F. H. Spedding, E. I. Fulmer, et al., J. Am. Soc., 69 (1947) 2812
28 J. I. Harper, J. L. Olsen, and F. R. Shuman, Chem. Eng. Prog., 48 (1952) 276
29 J. C. Jarson and P. Dunnill, "Factor affecting scale-up of Chromatography", in Industrial Aspects of Biochemistry, Vol. 30, Part 1, spencer, B., Ed., North-Holland / American Elsevier, Amsterdam; and New York, 1974, 81
30 J. C. Janson, and P. Hedman, "Large-scale Chromatography of Protiens, in Advanced in Biochemical Engineering", Vol. 25, Chromatography Fiechter, A., Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1982, 43
31 J. M. Ryan, R. S. Timmins, and J. F. O'Donnell, Chem. Eng. Prog., 64 (8) (1968) 53
32 Z. Skabrahova, J. Kovar, et al., J. Chromatogr., 408 (1987) 372
33 常建华，耿信笃，西北大学学报，1989，19 (4) 103
34 Xindu Geng, Li'an Guo and Jianhua Chang, J. Chromatogr., 507 (1990) 1
35 耿信笃，冯文科等，高技术通讯，1991，7
36 W. H. Scouten, "Affinity Chromatography", Bioselective Adsorption on Inent Matrices, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1981
37 Porath, J. Chromatogr., 443 (1988) 3
38 A. Henschen, K. Hupe, et al., "High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry", VCH
39 E. P. Kroeff, R. A. Owens, et al., J. Chromatogr., 461 (1989) 45
40 时亚丽，耿信笃，高等学校化学学报（英文版），1992，印刷中
41 张玉奎，陈嘉彦等，863计划-生物技术领域年报，1989-1990，P102
42 P. Jusforgnes, and M. Perrut, No 542 at the Pittsburgh-New Orloans Meeting, 1985
43 A. Dobashi, Y. Dobashi, T. Ono, and Hara, J. Chromatogr., 461 (1989) 121
44 N. B. Afegan, N. F. Gordon, et al., J. Chromatogr., 519 (1990) 1
45 Teipel, John W., and Koshland, D. E., Biochemistry, 10 (1971) 792
46 Teipel, John W., and Koshland, D. E., Biochemistry, 10 (1971) 798
47 Anfinsen, C. B., and Haber, E., J. Biol. Chem., 236 (1961) 1361
48 Dawson, D. M., et al., Biochemistry, 6 (1967) 3204
49 Bickerstaff, G. F., et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 62 (1980) 305
50 Sela, M., White, F. H., Jr., et al., Science, 125 (1957) 691
51 耿信笃，常晓青，西北大学学报（自然版），1992，印刷中
52 Hershenson, S. in conference on Frontier in BioProcessing, 1986, Boulder, colorado, USA
53 Yamamoto, S., Nomura, M., Sano, Y. J. Chromatogr., 1987, 384, 25
54 Tarnowski, S. J.; Roy, S. K.; Liptak, R. A.; Lee, D. K.; Ning, R. Y., Methods in Enzymology, Interferons, Part C; Pestka, S., Ed.; Academic Press: Orlando, FL, Vol. 119, 153-65
55 Secher, D. S.; Burke, D. C. Nature (London) 1980, 285, 446-50
56 Novick, D.; Eshhar, Z.; Gig, O.; Marks, Z.; Revel, M.; Rubinstein, M. J. Gen. Virol. 1983, 64, 905-10
57 Robb, R. J.; Kutny, R. M.; Chowdhry, V. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80, 5990-4
58 Katzman, J. A.; Nesheim M. E.; Hibbard, L. S.; Maan, K. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78, 162-6
59 Hermann, S. H.; Mescher, M. F. J. Biol. Chem. 1979, 254. 8713-16
60 Leonard, W. J.; Depper, J. M.; Crabtree, G. R.; Rudikoff, S.; Pumphrey, J.; Robb, R. J.; Kronke, M.; Svetlik, P. B.; Peffer, N. J.; Waldmann. T. A.; Greene, W. C., Nature 1984, 311, 626-31
61 Smith, M. C.; Furman, T. C.; Ingolia, T. D.; Pidgeon, C., J. Biol. Chem., 1988, 263, 7211-15
62 梁恒，西北大学，硕士论文，1990
63 Corradini, D.; Rassi, Z. E.; Horvath, Cs.; Guerra, G. and Horse, W., J. Chromatogr., 1988, 458, 1
64 Philips, T. M.; Frantz, S. C.; Babashak, J. V. and Chmielinska, J. J., J. Chromatogr., 1988, 458, 185

65 N. B. Afeyan, N. F. Gordon, et al., J. Chromatogr., 519 (1990) 1—29
66 徐明波，董晓杰等，色谱，1991，9 (25)，284—7
67 Chem. Tech. (Leipzig) 1991, 43 (7), 265—8
68 C. Cachia, P. J. Flamion and J. P. Schreiber, J. Chromatogr., 593 (1991) 343—53
69 L. L. Radulovic, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1985, 128: 75
70 张西哲，阎继茂等，生物化学杂志，1992，8 (2) 247
71 郑远旗，贾一平，生物化学杂志，1992，8 (2) 251
72 Li Huaru, Geng Xindu, J. Liq. Chromatogr., 15 (1992) 707
73 Feng Wenke, Geng Xindu, Chinese Chemical Letters, 2 (1991) 383

第八章　非线性色谱原理及其在蛋白质分离与纯化中的应用

黄骏雄

（中国科学院生态环境研究中心，北京，100085）

第一节　概　述

随着生物技术的发展、生物制品的广泛应用，分离与纯化显得越来越重要。因为这些物质的生产过程无论是通过生物还是化学途径，经常伴随着生成其它许多复杂的副产物，所以都需要分离与纯化，除去未反应的物质或生成的副产品，然后才能使用，否则就会影响它的性能，甚至产生副作用。生物制品的传统分离纯化方法常用超离心、盐析沉淀、超滤、萃取等，或组合使用上述各种方法以达到最终纯化的目的。但是这些经典方法由于劳动强度大、费时、低效，不适应当前生物技术迅速发展的需要。

色谱分离技术尽管在本世纪初已出现，但由于缺乏高效固定相填料以及先进的自动化仪器，因而作为分离与纯化的手段一直未能充分发挥它的作用。由于50年代气相色谱的出现和蓬勃的发展，为色谱仪器化奠定了雄厚的物质基础，致使高效液相色谱(HPLC)在60年代中期由于高效填料的出现获得了突破性的进展。在此后的20多年中，气相色谱与液相色谱在分析化学领域内，尤其是对多组份复杂体系的分析几乎占了绝对的统治地位。生物技术、药物、食品、农副产品加工及废弃物的资源化在近年来的迅速发展，对高效的分离与纯化技术的要求更为迫切，致使色谱学在理论上从线性色谱发展到非线性色谱，实验方法上从分析规模转向制备规模。本文主要根据近年来色谱科学的最新发展成就，综述了非线性色谱的理论基础和发展及其在蛋白质分离与纯化中的应用。由于篇幅限制，主要限于高效液相色谱的范围，不涉及气相色谱、薄层色谱及其它色谱技术。

一、色谱法的基本特点

色谱学是一门以物理化学为基础的分离与纯化科学，与其它分离纯化法相比它具有以下几个基本的特点。

1. 分离效率高

色谱分离的效率之高是其它分离技术所无法相比的，尤其是细颗粒多孔球形的高效填料问世后使色谱柱的柱效有更大的提高。如果按理论塔板数来表示柱效率，那么每米可达十几万的塔板的色谱柱是很平常的，这相当于每个理论塔板的高度只有2个固定相颗粒的距离。这种高效的色谱柱尤其适合极复杂组份的分析。由于效率是如此之高，在通常HPLC中柱长只有25cm，有的甚至短到3.5cm，即使如此短的色谱柱，却仍可以分离多组份的蛋白质混合物。图8

-1 表示用无孔的 ODS 微球 TOSOH TSK -NPR 分离蛋白质的情况。

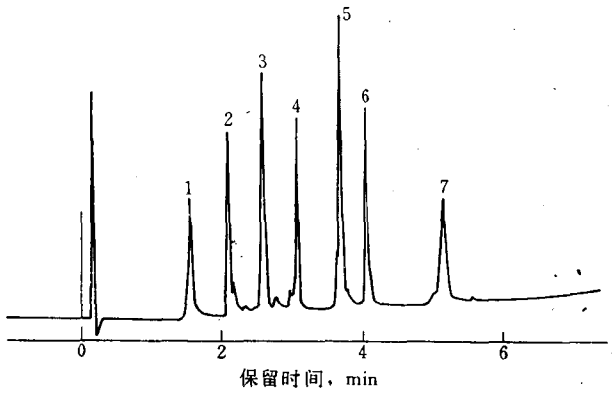


图 8-1 TSK - 十八烷基无孔聚合物反相柱分离蛋白质

色谱柱： TSK ODS-NPR(内径 4.6×35mm)； 流速：1.5ml/min； 温度：25℃； 检测器：UV220nm

样品： 1. 核糖核酸酶；2. 胰岛素；3. 细胞色素 C；4. 溶菌酶；5. α-乳清蛋白；6. 肌红蛋白；7. 卵清蛋白

淋洗条件： 线性梯度：乙腈在 0.05%三氟醋酸中 8min 内从 20%至 80%

2. 应用范围广

HPLC 的应用范围之广也是其它分离技术无法相比的，从极性到非极性，离子型到非离子型，小分子到大分子，无机到有机及生物活性物质，以及其它热稳定或热不稳定的化合物，可以说无所不包。尤其是对生物样品的分离分析，是其它方法无法代替的。

3. 操作参数多

色谱的可变操作参数之多也是其它分离技术无法相比的。若改变流动相，可用气体、液体或超临界流体。在气、液、流体中又有许多不同的物质可选用。固定相可用液、固两大类，每类中又有许多种可供选择，特别是在 HPLC 中，按分离机理不同，又有正相吸附、反相分配、疏水作用、离子交换、体积排斥、亲和作用等不同色谱技术。根据展开方式不同，又有前沿展开、洗脱展开、置换展开之分。若按流动相的强度随时间变化不同又可分为等强度洗脱与梯度洗脱，加上流动相的 pH 值、离子强度、有机溶剂的含量、分离温度等参数的变化，使整个分离过程随着上述各种参数的变化适应于各种不同的样品分离的需要，应用于各种困难复杂的场合。

4. 高灵敏度在线检测

与其它分离手段相比，色谱具有高灵敏度在线检测的特性。根据不同的物理与化学的原理，HPLC 具有不同的高灵敏度的检测器，适用于多种千差万别样品的需要。这些检测器不但稳定性好，信噪比高，同时都能进行连续的在线检测，及时掌握分离与纯化过程中的情况，保证在要求的纯度下得到最高的产率。

5. 快速分离

HPLC 由于采用了高压溶剂传输系统，即使采用高效细颗粒填料，也能保证分离过程在一定的线速下进行，而且由于单位柱长的柱效提高，柱长可以大大缩短，更加快了分离的速度，从而可以提高单位时间的产量。

6. 连续自动化操作

色谱分离过程本身与进样之间还不能同时连续进行，也就是说它还是一种间歇式的操作过程。电脑用于色谱分离过程以后，从最初的简单数据处理发展到目前作为控制操作的中心，使大量的样品可以按事先设置的程序进行完全自动连续的操作（尽管每一次操作仍是间歇式的），包括自动进样、分离后的样品馏份自动收集。未达要求纯度的馏份根据先前设定的指令进行再循环分离，或返回样品槽重新进样。这种高度的自动化操作，对大规模分离与纯化生物样品尤为重要，不但保证了产品的质量，提高了产率，而且节省了大量劳动力，降低了生产成本。色谱法尽管在过去几十年内相当长的一段时间里主要被作为重要的分析手段，正是由于上述这些特点，在生物技术蓬勃发展、迫切需要有效的分离纯化方法的今天，人们还是认为色谱是最为理想也是最有发展前景的一种分离与纯化生物大分子的方法[1,2]。

二、线性色谱与非线性色谱

线性与非线性是数学函数的概念，表示自变量与应变量之间的关系。在色谱学中，如果流动相中样品的浓度 C_m 与固定相中样品的浓度 C_s 之间呈线性关系，那么在这种情况下的色谱分配过程就称为线性色谱，即：

$$C_s = KC_m \tag{8—1}$$

此处 K 为分配系数。如果 C_s 与 C_m 之间不存在线性关系，而是出现其它的函数关系，那么相应的色谱分离过程就称为非线性色谱。

在实践过程中得知，当样品浓度很低时，C_s 与 C_m 之间往往保持线性关系。在通常分析工作中，由于使用样品的量很少，尤其用洗脱方式展开时，少量样品注入色谱柱后马上就被流动相稀释，因此浓度往往很低，所以分析工作大多数属于线性色谱范围。然而在进行制备工作时，为了提高产率、降低成本，必须提高单元操作的进样量（提高浓度或增加体积），此时样品浓度往往很高。在高浓度时 C_s 与 C_m 之间往往不出现线性关系，而是以其它函数（如指数或对数函数，甚至更复杂的函数）形式出现，所以大多数制备工作都属于非线性色谱范围。但是这并不是说分析色谱就是线性色谱，而制备色谱就是非线性色谱。因为分析和制备只是色谱的目的，而线性与非线性都是色谱分离过程中样品浓度在两相之间关系的内在特性。这是两个完全不同的概念，千万不可混淆起来。制备工作中有可能属于线性色谱的范围，例如根据分析柱上得到的色谱参数简单地加以放大，用来增加进样量达到制备样品的目的，也就是通常的线性制备色谱。同样，分析工作中也有可能属于非线性色谱的范围，例如痕量杂质分析中，为了提高灵敏度、降低最小检测极限，通常采用增大进样量的办法。此时样品中主要成份在两相中的浓度呈现的都是非线性的关系。尽管杂质的浓度很低，但是主要成份的非线性特征也会影响到痕量杂质的色谱行为。所以我们必须明确线性与分析、非线性与制备之间的基本概念及其差别。

非线性色谱与线性色谱中样品色谱行为的根本不同表现在以下几个方面。

（1） 样品的保留值可变。线性色谱中同一样品的保留值是常数，只随样品不同而变化。但在非线性色谱中它不仅是样品的函数也是其浓度的函数，也就是说，保留值不仅随不同样品而变，而且同一样品不同的浓度，其保留值也不同。所以在非线性色谱中，保留值不能作为定性的指标，这是它与线性色谱的根本不同点之一。

（2） 峰形的不对称性。在线性色谱中峰形一般说来都是高斯正态分布的对称峰。但是在非线性色谱中，由于 C_s 与 C_m 之间没有线性关系，因而峰形一般都不对称，出现“拖尾”或“伸舌头”的现象。

（3） 色谱峰的峰高与浓度不是线性关系。在线性色谱中峰高与组份浓度呈线性关系，即

峰高随浓度增加的速率不变。峰高是色谱定量分析的重要数据，通过校正曲线，从峰高可以测得组份的含量。但在非线性色谱中，峰高增加的速率随浓度的增加而逐渐降低，因而峰高不能作为定量分析的指标。

第二节　非线性色谱理论基础

非线性色谱理论是研究样品在固定相与流动相中的浓度处于非线性关系的状态下，各种实验参数对色谱分离过程的影响，建立起柱参数、溶质性质及操作条件之间的定量关系式[3]。由于此时 C_s 与 C_m 不呈线性关系，所以必须首先了解它们之间的函数关系，也即要研究吸附等温线及相应的吸附模型。

一、吸附过程及吸附等温线

吸附指一种通常发生在两相界面上的现象：处在界面上的分子或原子与其内部的分子或原子具有不同的能量与性质，产生了一种不平衡的倾向，造成界面的分子或原子数与内部不同，这种差异就形成了吸附现象。

吸附过程主要分为两大类：化学吸附和物理吸附。化学吸附热大，吸附过程往往是不可逆的；而物理吸附热小，吸附往往是可逆的。在非线性色谱分离与纯化生物大分子的过程中，需要的吸附是后者而不是前者，因此在选择分离与纯化的条件时，必须避免化学吸附的产生。表 8－1 列出了两种吸附过程的主要区别。

吸附等温线是指在一定温度下物质分子在两相界面上进行的吸附过程达到平衡时它们在两相中浓度之间关系。它不但在热力学研究中具有重要意义，而且在非线性色谱学的研究中起着重要的作用。

表 8－1　物理吸附与化学吸附特征比较

性　质	物 理 吸 附	化 学 吸 附
吸附热	较小 （一般不到蒸发潜热的 2 或 3 倍）	较大 （大于蒸发潜热 2 或 3 倍，与化学反应热相当）
可逆性	快速、非活化、可逆	缓慢、活化、不可逆
吸附层厚度	单分子或多分子层	单分子层
选择性	非选择性	高度选择性
电子转移	无电子转移，尽管有时被吸附分子会极化	电子发生转移，导致被吸附分子与吸附剂表面成键

在 HPLC 领域内常遇到的吸附等温线可分为下列几类，即凸形、凹形、S 形、H 形和阶梯形。图 8－2 列出了这几种典型的吸附等温线及其相应的色谱峰形。凸形吸附等温线是液-固系统中常见的一种，通常出现于大多数小分子化合物，它反映了溶质分子在固体表面达到饱和时生成了单分子吸附层。随着溶质浓度的增加，吸附等温线的曲率逐渐减小，最后为零即达到饱和态。H 形等温线是凸形等温线的特殊状态，它代表了一类很容易在固体表面吸附的物质，而且很容易达到饱和态，这类吸附主要是一些分子量大的聚合物，如聚乙烯、聚苯乙烯等高聚物及酶、核酸、蛋白质、糖等生物大分子。凹形吸附等温线是适用于在低浓度下已吸附的被吸附分子又能吸附在液相中的分子、从而生成多分子吸附层的那些物质，所以这种吸附等温线的曲率随浓度的增加而增加。S 形等温线实际上是凸形与凹形两种等温线叠加的产物，它代表了被吸

附的分子之间具有很强的作用力，能进一步吸附其它分子，而溶质分子与固相表面的作用力相对较弱，或者与表面覆盖率无关。所以当溶质浓度增加时，分子在固相表面逐渐吸附，趋于稳定后被吸附的分子又吸附其它分子，这就是反S形。若最初吸附不强，但被吸附分子与未吸附分子作用力却十分强烈，则容易形成正S形曲线。这两种类型在生物大分子的液固系统中有时会遇到。阶梯形的吸附等温线代表了被吸附的分子在固相表面随液相中溶质浓度的增加会发生吸附取向的变化或吸附状态的改变，每一个阶梯代表了一种吸附态。

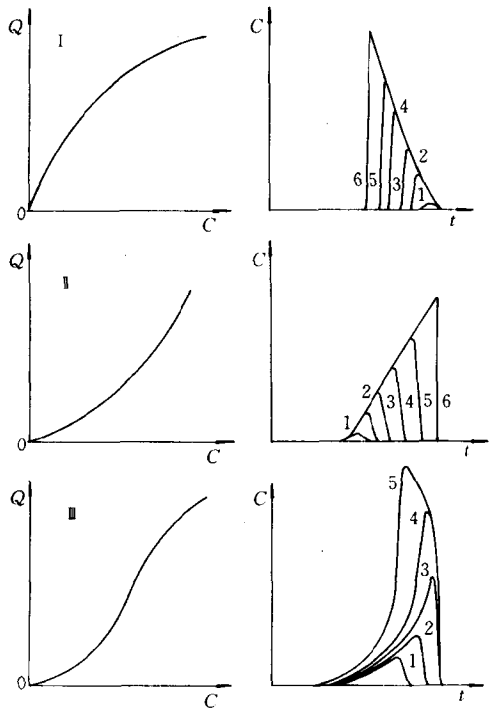


图 8－2　3 种典型的吸附等温线及相应的色谱峰形
(I)　凸形；　(II)　凹形；　(III)　S 形

从吸附等温线所提供的信息可以(1)预测代表该吸附等温线的组份在非线性色谱中色谱峰的形状。通常凸形等温线产生“拖尾”(即前端陡峭，后沿平坦)的峰形，而凹形等温线具有“伸舌头”(即前沿平坦，后缘陡峭)的峰形。(2)为非线性色谱分离与纯化物质选择最佳条件。由于吸附等温线对环境变化(如 pH 值、离子强度、流动相与固定相的组成等)十分敏感，所以在非线性区域内被分离物质等温线的性质反映了它们在非线性色谱分离过程中的行为。(3)反映被分离物质分子与固定相表面的作用，从而研究分子的构型及吸附状态。因为吸附等温线的形状是判断分子在表面吸附机理的重要信息。如果样品分子在表面形成单分子层，根据比表面的大小还可测得吸附分子的直径以及分子吸附构型等许多重要的物理参数。(4)建立分子结构-吸附之间的定量关系，从而由分子结构预测吸附性能。因为样品分子的总吸附能应该是分子中各个原子与官能团吸附能的总和，如果能正确测定各种类型化合物中不同原子与官能团的吸附能，就可以计算出分子的总吸附能。所以只要知道分子结构，就能预测出它在某种固体表面的吸附行为。

吸附等温线的测定可以分为静态与动态法两大类。静态法较简单，是一种经典的方法：将被测物质溶解在溶剂中配成一定浓度的溶液，再放入一定量的固相吸附剂，等体系达到平衡后，根据溶液浓度的减少(ΔC)、溶液体积(V)和吸附剂量(G)，就可以计算溶质在吸附剂上的

浓度(q)。

$$q = \Delta C \cdot V / G \qquad (8—2)$$

配制一系列浓度的溶液，可以得到一系列 q 值，将 q 与其相平衡的 C 作图，即可得该溶质在液固系统中的吸附等温线。由于吸附等温线是温度的函数，故上述测定要在恒温下进行。静态法虽方便简单，不需特殊仪器，但测定缓慢，特别是生物大分子在静态液固系统中达到平衡的时间很长，有时难以判断是否达平衡，所以数据不易测准，影响结果的可靠性。而且需要较多的被测样品，一般都需要几百毫克乃至克级，对于那些昂贵的生物样品是绝对不可能的。用动态法测定可弥补静态法的许多不足。动态法最早是用气相色谱原理来测定气固或气液两相中的吸附等温线的，常用的有 4 种方式：(1)前沿分析(FA)；(2)特征点前沿分析(FACP)；(3)特征点洗脱(ECP)；(4)平台洗脱(EP)[4]。在 80 年代初，这几种技术被液相色谱法用于测定生物大分子在液固系统中的吸附等温线，在此不准备详细讨论各种方法，表 8－2 列出了它们相互的比较。由表 8－2 可知，FA 是一种可以得到高精度吸附等温线的测量法。

表 8－2　FA、FACP、ECP、EP 测定吸附等温线的比较

方　法	检测器校正	进样量	进样次数	扩散影响	速度	精度
FA	不需	大	多次	小	快	高
FACP	必需	小	一次	大	快	可以
ECP	必需	很小	一次	大	快	一般
EP	不需	很大	多次	小	慢	可以

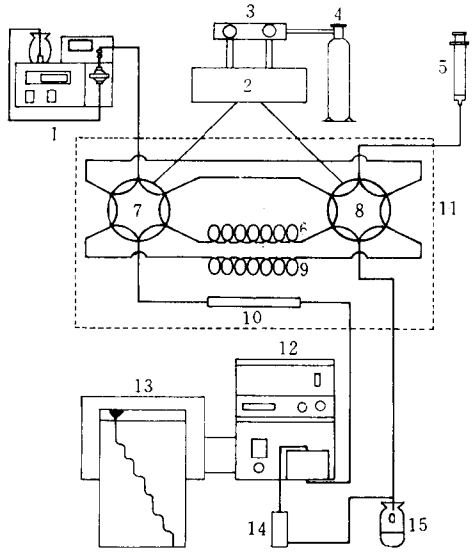


图 8－3　微量吸附等温线测定仪流程图
1—高压泵；2—气动阀；3—电磁阀；4—压缩空气；5—进样；6—样品管 A；7—六通阀 A；8—六通阀 B；9—样品管 B；10—吸附柱；11—恒温水浴；12—检测器；13—记录仪；14—流量计；15—废液瓶

为了减少样品用量，作者研制了一种微量吸附等温线测定仪(图 8－3)。吸附柱是内径 0.5～1mm、长 3～5cm 的毛细管，内装固定相吸附剂约 4～27μl。由于吸附剂量少，达到饱和所需的溶质量也少。样品管 A 与 B 为内径 1mm、容积约 2ml 的不锈钢管，与两个六通阀 A 与 B 相连，它们被交替与吸附柱相通，当 A 与吸附柱相连时 B 则与注射器相通，可以将另一浓度溶液充满 B 管，反之亦然。A 与 B 两个六通阀通过气动阀作同步切换。高压泵输送液相交替流过样

品管 A 与 B 到达吸附柱，经吸附平衡后到达检测器，检测器输出讯号至记录仪，就可得到如图 8－4 那样典型的台阶形前沿分析色谱图。从每一个台阶可以计算出与溶质在流动相中的浓度 C 相对应的固定相的浓度 q。通过一组 C_1、…、C_n 与 Q_1、…、Q_n 就可以作出吸附等温线[5]。

利用上述方法，测定了不同生物大分子在常用 HPLC 填料上的吸附等温线，研究了不同操作条件对吸附等温线及大分子在固定相上吸附行为的影响[6,7]。

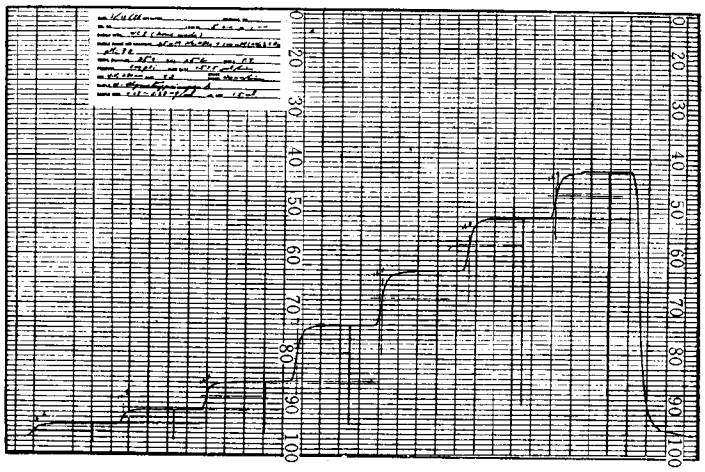


图 8－4　前沿分析测定 α-胰凝乳蛋白酶 A 在弱阳离子交换剂(WCX)上吸附等温线的色谱图

二、非线性色谱基本理论

非线性色谱理论是通过研究被分离物质在两相中呈高浓度情况下的浓度变化与吸附等温线、传质速率、进样方式等因素的关系，建立起定量的函数形式，从而能预测最佳分离条件，得到满意的分离结果。多年来许多学者做了大量的工作，采用计算机模拟方法，讨论了非线性色谱理论中各参数之间的关系[8,9]。为简化起见，在此只讨论单组份系统。

1. 吸附平衡热力学

当被分离物质在色谱系统中达到热力学平衡时，它在液相与固相中的浓度关系可用吸附平衡方程式表示：

$$S+A \underset{K_d}{\overset{K_a}{\rightleftharpoons}} S-A \tag{8—3}$$

式中 K_a、K_d 分别为吸附与洗脱常数。若用 Q 代表溶质 S 吸附在吸附剂 A 表面的浓度，C 为溶质 S 在流动相中的浓度，则上述平衡过程中的浓度关系可表达为函数 $Q=f(C)$。这种函数有许多不同的表达式，如 Freundlish、BET、Langmuir 、Jovanovic 等。但对大多数化合物而言，Langmuir 是用得最多的一种，即：

$$Q=aC/(1+bC) \tag{8—4}$$

式中 a 和 b 为吸附常数，a 为吸附等温线在原点的斜率，b 是结合常数。$-ab$ 为吸附等温线在原点的曲率，负号表示向 x 轴弯曲。对于多组份(k 个)体系，Langmuir 方程式变为：

$$Q_i=\frac{a_iC_i}{1+\sum_{n=1}^{k}b_nC_n} \qquad (1\leqslant i\leqslant k) \tag{8—5}$$

若一个含二组份的二元体系，就可以得到下列一组方程式：

$$Q_1 = a_1C_1/(1 + b_2C_1 + b_2C_2)$$

$$Q_2 = a_2C_2/(1 + b_1C_1 + b_2C_2)$$

上式中 Q、C、a、b 与式(8—4)意义同，下标 1 与 2 代表不同组份。显然 a_1/a_2 即为分析色谱中的相对保留比 α。

2. 吸附平衡动力学

色谱分离过程实际上是一个由不平衡到平衡、周而复始的连续过程。平衡的速率由(8—3)式可以表达为：

$$\frac{dQ}{dt} = K_a(Q_0 - Q) - K_d \cdot Q \qquad (8—6)$$

Q 为溶质 t 时在固定相上的浓度；Q_0 为溶质在固定相上的饱和浓度，它也等于固相表面的活性中心密度；K_a 与 K_d 为吸附与脱附常数。对于多组份体系，就要列出对应的多组份联立方程式。

3. 色谱基本物料平衡方程

色谱分离过程的基本物料平衡方程式为：

$$\frac{dC}{dt} + \Phi\frac{dQ}{dt} + \frac{d(uC)}{dz} = D\frac{d^2C}{dz^2} \qquad (8—7)$$

C、Q 分别为 t 时，距离为 z 时溶质在流动相与固定相中的浓度；Φ 为相比，即固定相与流动相的体积比，$\Phi=(1-\varepsilon)/\varepsilon$，$\varepsilon$ 为色谱柱空隙度；u 为流速；D 为轴向扩散系数，代表由于分子纵向扩散与涡流扩散(由填充不匀造成)产生谱带变宽的权重。

如果柱子足够长，即柱效无限，同时传质过程〔式(8—6)〕服从一级动力学方程，那么(8—7)式中 D 与理论塔片高度 H、柱长 L 及死时间 t_0 有下列关系：

$$D = HL/2t_0 \qquad (8—8)$$

若将方程式(8—4)、(8—6)、(8—7)、(8—8)合并，即代表了单组份物质在色谱分离过程中的运行规律。遗憾的是至今无法得到这组方程的分析解，即使运用电脑，也无法得到它的数值解。为此必须要作若干假设，简化条件，使之能解释非线性色谱中若干现象。这里我们只讨论溶质在两相中达瞬间平衡，而且轴向扩散小到可以忽略的情况，此时可以认为柱效是无限的，那么方程(8—7)可以简化为：

$$\frac{dC}{dt}(1 + \Phi k') + u_0\frac{dC}{dz} = 0 \qquad (8—9)$$

其中 k' 为溶质在两相中吸附等温线的导数 dQ/dC；u_0 为流动相的线速度。式(8—9)经简单变换可写成：

$$u_z = u_0/(1 + \Phi k') \qquad (8—10)$$

其中 u_z 为溶质谱带的移动速度。方程式(8—10)表示了溶质谱带速度与流动相线速、相比 Φ 及吸附等温线上相应于浓度 C 时的导数值 k' 之间的关系。应用此式可以解释为什么不同形状的吸附等温线会产生不同形状的非线性色谱峰。

当实验参数确定后，u_0、Φ 均为常数，所以 u_z 只与 k' 有关。由于 k' 是吸附等温线相应于各浓度的导数，所以它在吸附等温线的线性范围内是常数，在非线性区域内是浓度的函数。因而在非线性色谱中溶质分子在不同浓度时移动的速度是不同的，这就是随着色谱过程的展开峰形发生变化的原因。下面根据不同形状的吸附等温线分别加以讨论。

(a) 线性吸附等温线(k' 为常数)。从(8—10)式可知，由于各参数均为常数，与溶质浓度

无关，所以溶质谱带移动速度不随浓度变化，整个谱带以恒定的速度 u_z 随流动相移动。由于我们假设轴向扩散忽略不计，所以谱带形状只与进样函数有关。严格而言，在色谱柱内展开时谱峰不会有任何变化。

(b) 凸形吸附等温线(k'随浓度增加逐渐变小)。由于溶质浓度低时 k' 值大，而浓度高时 k' 变小，因而从(8—10)式可知 u_z 随 k' 增大而变小，反之随 k' 变小而加快。这表示溶质分子在浓度不同的区域内移动速度不同，低浓度区域内的分子移动慢，高浓度区域内的分子移动快。当样品进入色谱柱后，随着流动相的移动，就逐渐形成了前沿陡峭后沿拖尾的色谱峰。浓度越大，拖尾越严重。

(c) 凹形吸附等温线(k'随浓度增加逐渐变大)。这种情形与凸形等温线恰恰相反，所以在低浓度区域内溶质分子移动快，高浓度区域内移动慢。当样品进入色谱柱后，在前沿低浓度区内分子移动得快，高浓度区的分子慢，而在后沿的分子也具有同样的动力学行为，这就形成了前沿平坦而后沿陡峭的所谓"伸舌头"的峰。尽管在柱头开始时都是对称的谱带。

(d) S 形吸附等温线(k'随浓度增大先增加随后减小)。具有这种吸附行为的分子在低浓度区域内移动较快，随着浓度的增加它们的移动逐渐减慢，到某一浓度范围内(相应于吸附等温线的拐点附近区域)不同浓度的分子作等速移动，相当于线性吸附区。浓度再增加时，移动速度又逐渐增加。结果就出现了"卷浪"状的峰形。

从上述的讨论中可以看到，由于 k' 值从线性区的常数转入到非线性区为浓度的函数，造成了非线性色谱中的一个特点即峰形不对称，随着 $d^2Q/dC^2>0$，峰形伸舌头；$d^2Q/dC^2<0$，则峰形拖尾；当 $d^2Q/dC^2=0$ 时，峰形对称。第二个特点是峰极大值对应的时间(即保留时间)t_R 不是常数，而是浓度的函数。当 $d^2Q/dC^2>0$ 时，t_R 随浓度增加而增加；当 $d^2Q/dC^2<0$ 时，t_R 随浓度增加而减小；当 $d^2Q/dC^2=0$ 时，t_R 与浓度无关。从S 形吸附等温线中浓度变化所产生峰形的改变最清楚地说明了上述的情形。

色谱分离过程实际上是一个多组份的分离过程，所以单组份的非线性色谱理论不符合多组份的分离情况。由于多组份的理论极为复杂，至今未能得到满意的结果[10,11]。而简化的单组份理论在一定程度上却有助于我们去预测最佳分离条件，所以仍有它的实际意义。而多元组份非线性色谱的理论仍有待于我们去进一步的研究。

第三节 非线性色谱的实验方法

由于非线性色谱涉及的样品浓度大大高于线性(分析型)色谱的，因此通常的分析型色谱仪及其流程就不完全符合非线性色谱的要求，某些部件必须加以改造才能满足要求，以便于在优化条件下使用，而且在实验方法上也需加以适当的改变。

一、非线性色谱中的固定相及色谱柱

1. 固定相

在生物大分子分析型高效液相色谱中的固定相目前几乎都用细颗粒大孔径的填料，但是在非线性色谱中粗和细的颗粒两者都在使用。原则上讲细颗粒填料的柱效要高，但价格也贵。粗颗粒填料虽柱效低，但价格便宜，而且柱压降低适合于大型制备柱。填料的基体仍以硅胶和有机树脂两大类为主。从目前工作来看，如果硅胶和有机树脂基体的理化性能(如孔隙度、颗粒

大小、比表面及键合的官能团)都一样,那么它们呈现的色谱性能也没有显著差别。关于填料孔径大小的要求对不同生物大分子也不一样,例如分离核酸要求孔径至少在 50nm 以上,分离蛋白质一般要求在 30～100nm,而且随分子量不同而异。30～50nm 可分离 30～100kD 的蛋白质,而分离 100kD 以上的蛋白质要求孔径在 80～100nm。孔径越大,比表面越小,因而填料对样品的负载量也降低,而且机械强度也减弱。但是由于传质阻力减小而使不同范围分子量的蛋白质都能得到分离,故使填料效率提高。以下就分离生物大分子用的几种主要填料加以讨论。

(1) 反相填料 在使用反相填料分离生物大分子时,除了上述各项因素要考虑之外,烷基链长是很重要的因素。反相填料上键合的烷基链长似乎与蛋白质的分子量也有反相的关系,即长链烷基填料(如 C_8～C_{18})适合于分离小肽,而短链烷基(如 C_4～C_8)适合于多肽及蛋白质。

(2) 疏水作用填料 这种填料的疏水作用比反相填料弱,主要是填料表面烷基密度小、链长短。有的甚至用极性较大的 *N* -酰基和烷氧基的乙二醇通过丙基硅烷接到硅胶表面。此外还有在硅胶表面先键合亲水的高分子薄层,再使薄层酰基或烷基化。对于有机载体通常表面键合成聚醚或苯基。后者比前者疏水作用强,用于分离在聚醚固定相上不保留的亲水性强蛋白质。

(3) 离子交换填料 在生物大分子分离中常用的包括强阳、弱阳、强阴、弱阴 4 种填料。强与弱型研究采用哪一种要根据分离的对象,没有普遍通用的规则。由于电荷密度是离子交换分离中的关键因素,它受溶液的 pH 值影响。而强离子交换填料的 p*K* 值受 pH 值影响小,在较广泛的 pH 值范围内基本不变。所以唯一受 pH 值影响的是生物大分子本身的电荷密度。但是对弱离子交换填料情况就复杂些,因为离子交换剂本身的 p*K* 值也受 pH 值影响,所以无论是填料本身还是生物大分子的电荷密度都与 pH 值有关。因此从获得优化条件来看,在强离子交换剂上比弱型更容易些。但是优化条件与选择性无关,有时用弱型离子交换填料可比强型得到更好的选择性,因为基体的疏水性及配位体的密度稍稍变化就会对弱型填料的选择性产生很大的影响。

(4) 体积排斥填料 无机填料以硅胶为主。缺点是不能用于高 pH 值的流动相,而且表面无法做到真正惰性,经衍生化处理后会多少残留些 OH 基,它会起吸附或阳离子交换剂的作用,目前采用在其表面键合或涂渍亲水性高分子涂层,如聚乙烯醇等。有机填料中常用 Pharmacia 出的琼脂类填料,如 Suprose 。其虽不表现出静电作用,但在盐浓度大于 0.5mol/L 时,对蛋白质有疏水作用反应,这种疏水作用力是琼脂在交联过程中引入的。其它的有机填料如聚甲基丙烯酸酯类、聚乙烯醇类等多少具有疏水作用及阳离子交换剂的特征,因而至今缺乏十分理想的体积排斥填料。

(5) 亲和填料 亲和填料尽管选择性极好,但最大的问题是商品种类太少,几乎对每种生物大分子的分离都需要合成该种大分子所需要的特殊亲和填料,所以给色谱分离带来了一定困难。为此,目前出现了许多预活性的商品柱,如环氧、*N* -羟基丁二酰亚胺、重氮盐,只需将生物活性基团键合到这种柱上就可以使用。图 8－5 列出了以硅胶为基体合成带有各种不同活性基团的预活性填料的合成路线,它们与配位体进一步反应可以得到具有各种生物活性的亲和填料。此外,还有蛋白 A 与刀豆球蛋白 A 柱也已有商品出售,用于分离单克隆抗体、免疫球蛋白 G、糖蛋白、糖肽、糖脂等。

在目前使用的分离与纯化生物大分子的填料中,日本东洋曹达(TOSOH)公司生产的 TSK 系列是一种使用较广泛、性能较好的填料。表 8－3 列出了 TSK 系列的各种填料及主要

性能。

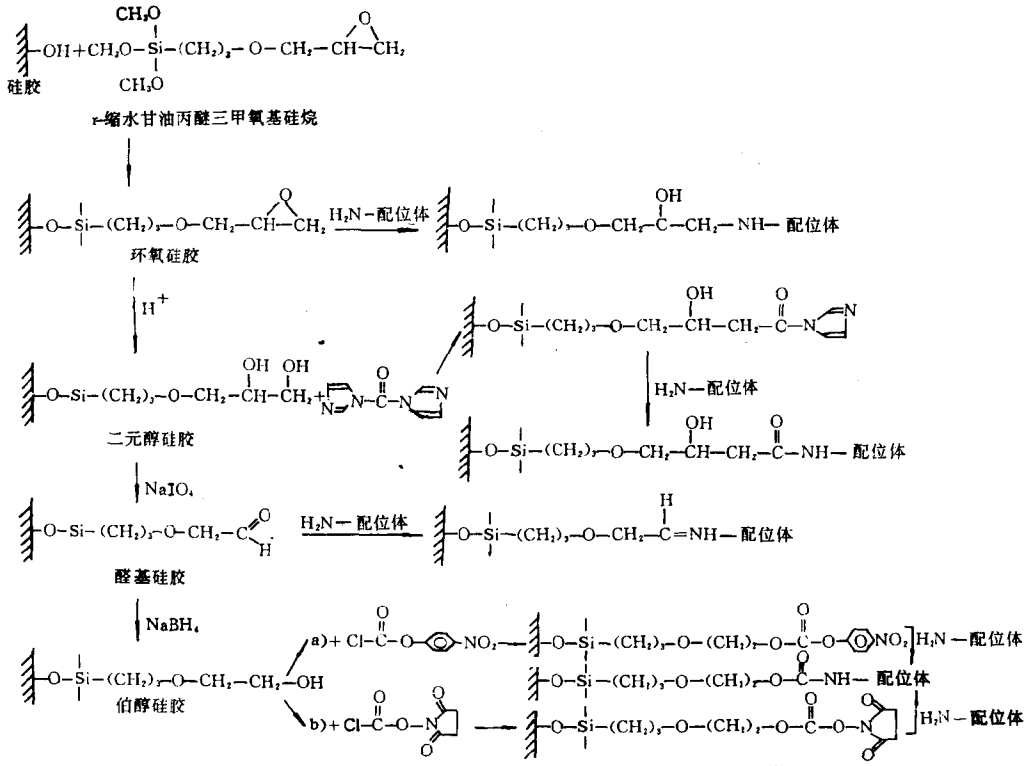


图 8-5　硅胶为基体合成带不同活性基团中间体及配位体的亲和色谱填料的合成路线

表 8-3　TSK 系列的填料及其性能

TSK-Gel 填料	类　型	用　途
G1000H, G2000H, ……, G7000H	聚苯乙烯型凝胶、体积排斥填料	高聚物分子量分布、聚合物添加剂分析等
G2000PW, G3000PW, ……, G6000PW	聚乙烯型亲水凝胶、体积排斥填料	核酸、糖类分离与纯化
G2000SW, G3000SW, G4000SW	硅胶型亲水凝胶、体积排斥填料	蛋白质、酶、肽类分离与分析
CM-2SW, CM-3SW	硅胶型弱阳离子交换剂(—COO^-)	
CM-5PW	亲水高分子型弱阳离子交换剂(—COO^-)	生物大分子、酶、蛋白质、肽、核酸等的分析、分离与纯化
SP-5PW	亲水高分子型强阳离子交换剂(—SO_3^-)	
DEAE-2SW, DEAE-3SW	硅胶型弱阴离子交换剂(—N^+HEt_2)	
DEAE-5PW	高分子亲水型弱阴离子交换剂(—N^+HEt_2)	

（续表）

TSK－Gel 填料	类　型	用　途
Phenyl－5PW	苯基键合的亲水高分子型疏水作用填料	生物大分子的分析与分离
Ether－5PW	乙二醇键合的亲水高分子型疏水作用填料	
Phenyl－5PW－RP	苯基键合反相填料（亲水高分子型）	分子量大的蛋白质和肽、分子量小的蛋白质、低分
Octadecyl－4PW	十八烷基反相填料（亲水高分子型）	子量的有机物、肽、核酸等的分析与分离
ODS－120A，120T及80TM	十八烷基反相填料（硅胶型）	
Oligo DNA RP	核酸反相填料（亲水高分子型）	
Amide－80	正相酰胺填料（硅胶型）	单糖、寡糖、多元醇的分离与分析
Chelate－5PW	二醋酸亚胺	含重金属离子 Cu^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+} 等蛋白质的分析与分离
Heparin－5PW	肝素	凝结因子、脂蛋白质、脂酶等的分析与分离
Blue－5PW	Cibacron 等 F3G－A	清蛋白、细胞生长因子、干扰素、转移酶、聚合酶的分析与分离
Boronate－5PW	间氨基苯基硼酸	糖蛋白、转移 RNA、核苷、核苷酸、酯、儿茶酚碱的分析与分离
ABA－5PW	对氨基苯甲脒	胰朊酶、牛凝血酶、肠激酶等的分析与分离
HA－1000	羟基磷灰石	蛋白质、肽、核酸的分析
Sugar AXI	单氨型强阴离子交换剂（恒强度淋洗）	单糖、双糖、醣醇的分析
Sugar AXG	单氨型强阴离子交换剂（梯度淋洗）	有机酸的分析
Enantio P_1，P_2，L_1，L_2	手性固定相填料	光学异构体分离
DEAE－NPR	弱阴离子交换剂（$-N^+HEt_2$）（实心亲水高聚物）	蛋白质快速分析与分离
SP－NPR	强阳离子交换剂（$-SO_3$）（实心亲水高聚物）	

2. 色谱柱及填充技术

以分离与纯化为主要目标的非线性色谱与分析色谱一样，色谱柱是极关键的部分。高效色谱柱是使分离纯化过程达到低投入高产出的重要因素，因此色谱柱的设计极为重要。首先，色谱柱长度的选择要考虑多种因素，例如，为达到一定的分离度就要求有一个起码的柱长，否则分离的组份就达不到所需的纯度。但是，不同的填充方法填充的色谱柱都有一个最长的限度，超过这个限度，就无法得到均匀的填充床。就目前用的匀浆填充技术很少填充长度超过 50cm 的色谱柱。此外柱效也不是与柱长永远呈比例增长，超过某一长度，柱效不再随柱长增加。还有高压泵的容量也不允许使用很长的色谱柱。诸如此类种种因素使我们要综合考虑，设计合理的柱长，因此并非越长越有利。在置换色谱中，超过最佳柱长，反而会降低产率、提高成本。其次，柱径的选择也很重要，柱径的增加不仅可使样品负载成平方的增加，而且也可使柱效提高，一旦色谱柱达到“无限直径”时，可以消除管壁效应带来的柱效损失，提高分离效率。

柱的填充目前主要仍用干法、湿法两种。干法简单、方便，不需特殊设备，但柱效一般较差，只适用于直径大于 30μm 的颗粒，而且更适用于直径较大的色谱柱。填充后的柱要通流动相稳定柱床，一般使用高压泵与色谱柱可以忍受的最大流速，这时往往由于柱床受压而在柱头出现空间，需要补充填料，如此反复多次，直到无空间为止。湿法填充主要适用于 20μm 以下的颗粒填料，分恒流与恒压填充两种。前者在高压泵允许的最大流速下填充色谱柱，后者用气动放大泵在 50～70MPa 下装柱。湿法又称匀浆法，根据制备匀浆技术的不同又可分为平衡密度、高粘度、静电分散或低密度低粘度剧烈震荡等方法，以使填料颗粒在装柱过程中分布均匀，不出现沉降现象。这些要求与填充分析柱差别不大，但当柱直径增大时，柱的稳定性就成了主要问题，刚填充好的柱在使用一段时间后经常在柱头出现空间。造成此现象的原因错综复杂，至今仍有待研究，但硅胶在流动相中溶解流失是其原因之一。为了防止出现死空间而降低柱效，对制备柱采用了压缩技术，它又可分为径向压缩、轴向压缩两大类。径向压缩的过程是，填料装在管壁柔软的容器中，外有不锈钢套管，在二管中间通入一定压力的气体，气体压力挤压装填料的管壁可以避免柱内死空间的出现，如图 8－6a 所示。采用这种办法即使用干法填充 15μm 的填料，也能得到满意的结果。其缺点是对直径较大的色谱柱，径向压缩会产生径向密度梯度，这种梯度会使流动相线速在同一横截面上不均匀，使峰形扭曲、变形，影响分离。轴向压缩是在柱一端或两端有气动活塞可以挤压固定相填料，防止死空间出现，如图 8－6b 所示。其缺点是每根柱都要有自己的一套活塞系统，而且活塞杆的长度要与柱相当，使整个柱系统变得很长。此外还有采用径向与轴向结合的挤压法，即在色谱柱中心插入一根带有锥面的活塞杆，通过锥面的挤压在径向与轴向同时产生压力，避免死空间的产生，如图 8－6c 所示。这种技术具有上述二者的优点，但也造成活塞杆端的密封及流动相和样品均匀分布等困难。

二、样品溶解与进样方法

用非线性色谱分离与纯化生物大分子时，制备合适的样品溶液是成败的关键之一。以蛋白质为例，一般溶解度有限，通常需加入其它试剂以增加它在水中的溶解度。常用的有 5%～60%甲酸、4～6mol/L 尿素、0.01%十二烷基磺酸钠(SDS)、0.1%三氯醋酸。除溶解度外溶剂的性质必须适应于所用的固定相，使大量的样品溶液导入色谱柱后不马上扩散，集中在柱头，以达到“塞式”进样的目的。例如在反相色谱中，溶解样品溶剂的极性必须大于流动相；吸附色谱中恰恰相反，溶剂的极性必须小于流动相；而在疏水作用色谱中，溶剂的离子强度不能小于流动相的离子强度等等。这些都是为了保证大量样品溶液进入色谱柱后会集中在柱头，不会在柱内展开，以免与流动相的展开发生干扰。

适当溶液制备后，进样方式也十分重要，这个在分析色谱中不引起注意的问题在大量分离与纯化工作中显得十分突出。即如何保证大量样品溶液能均匀分布在柱的截面上，使轴向扩散及局部超载降至最小。目前进样方法有两种：① 采用带样品管的六通进样阀。若样品管的容积太大(如大于 1ml)，在空管中会产生 Poiseuille 径向速度分布，使样品溶液带进入柱头时加宽，所以一个较好的办法是用大于固定相颗粒 2 到 3 倍的惰性实心颗粒填充样品管，可大大减少径向速度不均引起的进样区变宽。图 8－7 比较了空管与填充样品管造成样品区域分布的情况。②用高压泵直接输送样品进入色谱柱，由于与流动相混合，所以能保证样品均匀进入柱头的横截面。要注意样品的浓度不能太高，以免析出沉淀。样品进入色谱柱也有多种方式，如中心注射、锥型注射、横截面注射等。中心注射在进样体积较小时，分离效果好，但随进样体积增大柱效逐渐降低，而横截面注射恰恰相反。表 8－4 比较了这两种样品分布对柱效的影响。

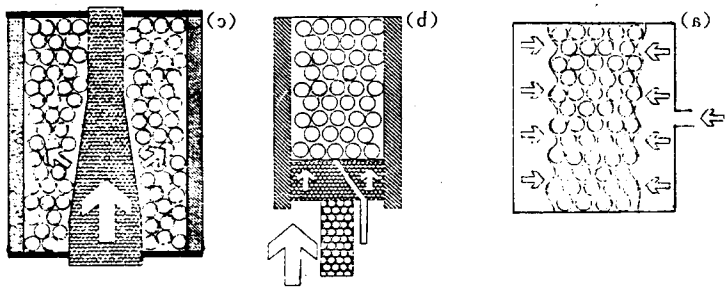


图 8－6　制备色谱柱中各种压缩技术示意图

（箭头指示压力的方向及大小）

(a)　径向压缩；　　(b)　轴向压缩；　　(c)　环形挤压

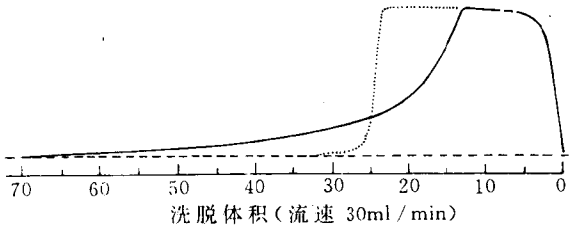


图 8－7　空管与填充样品管进样效果的比较

——：　空管（V＝25ml，内径 4.6mm）；

……：　填充管（V＝25ml，内径 4.6mm，填充 120μm 微珠）

表 8－4　中心进样与横截面进样对柱效影响的比较

进样方式	进样体积，ml	柱效 HETP，μm
中心进样	0.1	24.5
	0.2	25.0
	0.5	30.0
	1.0	58.0
	2.0	290.0
横截面进样	0.1	34.5
	0.2	33.5
	0.5	31.0
	1.0	40.5
	2.0	49.5

三、非线性色谱中 3 种常用的展开方式

超载洗脱、前沿分析的置换展开是非线性色谱中常用的 3 种操作方式。在实际工作中究竟选择什么方式要取决于样品的性质、所需的产品纯度及要求的产率。以下将分别讨论这 3 种展开的方式。

1. 超载洗脱

所谓超载洗脱与传统的洗脱色谱差别不大，只是样品在固定相上的负载超过了线性洗脱色谱的容量。当样品进入色谱柱后，其中不同组份随流动相以不同的速度移动，因而样品沿色谱柱展开时，由于不断被流动相稀释，浓度逐渐降低，形成较宽而平坦的峰。控制洗脱色谱中分离效率的主要因素有两个：①样品的选择性，这是与洗脱过程热力学有关的参数，取决于固定相、流动相及样品在两相中的吸附行为、温度等。②单位柱长的扩散效应，这是与洗脱过程动力学有关的参数，取决于固定相的颗粒度、柱填充的均匀性、流动相的线速度等。通常用理论塔板高度 H 作指标，应该越小越好。洗脱展开在制备工作中又可分为线性洗脱与非线性（即超载）洗脱两种，前者是指制备分离的样品浓度较低，在吸附等温线的线性范围；后者是指样品浓度很高，超出了吸附等温线的线性范围。显然，从提高纯化的产率来看，非线性洗脱法大大优于线性洗脱法，不但产率高、省时，而且节省大量溶剂及产品的后处理工作，但柱效率不如线性洗脱高，典型的色谱图如图 8－8a 所示。不论线性洗脱还是超载洗脱，与其它两种展开方式相比它的最大优点是易于为色谱分析人员所接受，因为它只须从分析色谱条件加以适当放大和修改即可用于制备洗脱，得到与分析色谱类似的分离效果。但它最大的缺点是样品在分离过程中不断稀释，增加了后处理的工作量，而且十分昂贵的固定相的利用率不如其它两种展开方式高。

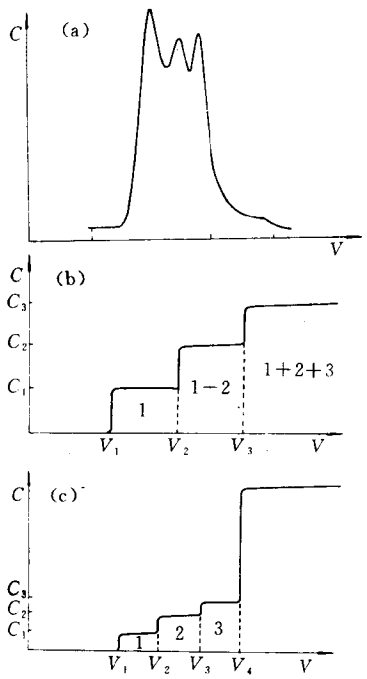


图 8－8　非线性色谱 3 种展开方式的典型色谱图
(a)　超载洗脱；　(b)　前沿分析；　(c)　置换展开

2. 前沿分析

前沿分析与洗脱展开不同，样品溶液不是作为一部分进入色谱柱，而是连续不断地输入色谱柱，即它本身起了流动相的作用。样品中不同组份根据与固定相作用力强弱不同，产生了不同的移动速度。若以组份浓度对流出时间作图，分离结果并不同于洗脱展开以谱峰形式出现，而是形成一个个台阶，如图 8－8b 所示，每个台阶表示在色谱柱流出液中至少增加了一个组份。所以第一个台阶代表一个组份，它的保留行为最弱。第二个台阶表示除了第一组份外，又至少多了一个组份，所以是二元混合组份，直至输入与流出的组成完全相同。因此前沿分析不

可能将样品中每个组份都分离回收，这与洗脱展开完全不同。但它很适合于浓缩痕量组份，使之进一步分离与纯化，也适合于产品的精制，除去痕量的杂质。前沿分析的另一个显著特点是在分离过程中由于样品溶液本身就是流动相，组份的浓度不会象洗脱展开中那样逐渐稀释。前沿分析在非线性色谱中还是测定样品吸附等温线常用的一种技术。

3. 置换展开

置换展开与洗脱展开差别不大，但大多数分析色谱工作者对它仍较陌生。两者主要的不同是在样品输入色谱柱后，用一种与固定相作用力极强的流动相通入色谱柱，去替代结合在固定相表面的溶质分子，这种流动相称为置换剂。样品在置换剂推动下沿色谱柱前进，如果色谱柱长度足够，最后会使样品中各组份按作用力强弱的次序，排列成一系列前后相邻的谱带。每个谱带在置换剂的推动下，以同样的速度即置换剂的流速向前移动，此时系统达到了平衡，如图8－8c所示。进一步展开不仅不会增加分离度反而由于纵向扩散使谱带边缘相互混合加剧，影响分离效果。

置换色谱的特殊优点是样品中各组份的浓度在展开过程中不但不会降低，有时甚至还能提高，即起到浓缩的作用。这是其它两种展开方式无能为力的。其次是单位柱长的固定相利用率也是在3种展开方式中最高的，特别是由于固定相的价格至今十分昂贵，因此对大规模制备工作，采用这种展开方式在经济上十分合算。

当然置换色谱也有它固有的缺点，首先是不易找到合适的置换剂。合适的置换剂要求：(1) 吸附等温线是凸形，而且吸附系数要大于样品中任何组份。(2) 在流动相中要易溶。(3) 不与样品及流动相发生任何化学反应。(4) 易于从固定相表面洗脱下来。此外还要考虑到价格、纯度等。因此寻找符合这些要求的理想置换剂特别是适合于生物大分子分离的更为困难。其次是要找到合适的固定相与流动相体系，使被分离的样品在此体系内的吸附等温线呈现凸形，否则无法进行置换展开。还有每次置换展开结束，一定要把色谱系统中的置换剂冲洗干净，即要使色谱柱再生后才能进行下一次展开。最后由于大多数色谱分析人员习惯于洗脱展开，对这种独特的置换展开较为生疏，也防碍了它在分离与纯化中的广泛使用。

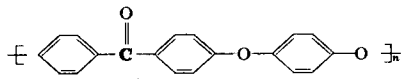
表8－5 非线性色谱中各种展开方式的比较

展开方式	柱尺寸	流速	稀释度	产率	是否要再生	与分析色谱可比性	收率
置换色谱	常规分析柱 Φ0.4～0.6×30～50	低	浓缩痕量组份	高	要	差别很大	＜100%
超载洗脱	制备柱 Φ20～100×300～500	高	稍稀释	高	不要	相似	可以调整常＜100%
线性洗脱	制备柱 Φ20～100×300～500	高	稀释严重	低	不要	相似	可以调整常接近100%

表8－5比较了非线性色谱中的超载洗脱、置换色谱与线性色谱中的线性洗脱，各自优缺点一目了然，有助于我们针对不同样品选用合适的展开方式。

四、色谱系统的生物相容性

色谱系统中所用的材料对生物大分子的分离与纯化有相当大的影响。通常液相色谱仪中与流动相接触的部件一般采用316号不锈钢，然而这种材料对生物大分子的色谱分离并不合适。首先由于生物大分子常常溶于不同pH值的缓冲溶液中，因而长期与316号不锈钢接触会产生不同程度的腐蚀，特别是用疏水作用机理分离生物样品时，流动相中高浓度的盐溶液对色谱系统的侵蚀更为严重，引起盐溶液外渗，析出沉淀，造成高压泵的密封性能变差，耐压能力降低，流量不稳，以至无法正常使用。其次是生物大分子在316不锈钢表面的严重吸附造成色谱定性与定量分析的困难，重复性差。尤其是在色谱柱两端的不锈钢过滤片部分，由于表面积大，极容易吸附生物大分子，严重时甚至会堵塞滤片，引起柱压突然增加。为解决上述问题，一般可采取以下几种办法：(1)选择合适的色谱条件，尽量减少生物大分子的吸附。因为生物大分子在不锈钢表面的吸附与许多实验参数有关，只要选择适当的实验条件就可以把生物大分子的吸附降到最小限度。(2)采用其它金属材料(如钛等)以降低生物大分子在其表面的吸附性能。(3)在316不锈钢表面用亲水性高分子材料进行化学处理。作者曾用异氰酸酯的加成反应处理不锈钢表面获得亲水性的薄层[6]，它不但大大降低了对生物大分子的吸附性能，而且具有良好的机械稳定性，能使用在各种不同的化学环境中。表8－6列出了各种不同材料及处理过的过滤片对蛋白质吸附性能的比较。(4)采用Peek工程塑料，它是一种线性芳香族聚合物，结构式为：



可适合于大多数化学溶剂。目前市场上已有用Peek工程塑料做的接头、连接管道、色谱柱等。当然Peek塑料也有缺点，它不适合于某些有机溶剂，如二氯甲烷、浓HNO_3、H_2SO_4、浓度大于15%的THF溶液等。

表8－6　不同材料的滤片对蛋白质吸附的比较

蛋白质	浓　度	平衡时间	吸附量，　μg		
	μm/ml	h	未处理316①	处理316②	钛
核糖核酸酶A	526	15	24	<1.87	17.2
α-糜蛋白酶原	437	12	20	<2.0	11.0
细胞色素C	525	14.5	15	<0.44	11.0
溶菌酶	570	13.5	24	<0.65	12.5

① 表面未经处理的316不锈钢滤片。

②用异氰酸酯的加成反应处理过表面的316不锈钢滤片。

第四节　非线性色谱在分离与纯化蛋白质中的应用

蛋白质是一种由氨基酸为基本单元组成的生物大分子，它与肽的差别在于氨基酸的数目，一般蛋白质的氨基酸有300～1000个，有的甚至达几千个，而肽的氨基酸数要少得多。

氨基酸分为基本骨架与侧链两部分，在至今所发现的21种氨基酸中基本骨架都是一样的，即NH_2—C—COOH，差别就在于C原子两边的侧链基团，蛋白质大分子的长链就是由氨基酸的基本骨架生成肽键—NH—CO—构成的。正是由于蛋白质长链两侧基团的类型与次序

的不同，形成了具有不同生物活性、千差万别的各种蛋白质。

蛋白质的生物活性与其长链的结构有很大关系，外界条件的变化（如温度、溶液离子强度、pH 值、有机溶剂等）都会影响它的三维空间结构，严重时使三维空间结构破坏而发生“变性”，有时就复活不了。这是分离与纯化过程中特别需要注意的问题，因为生物分子的分离与化合物分离的基本差别就在于不仅要“纯”还要“活”。因此分离条件的选择比化学分离更为严格，要求更高。

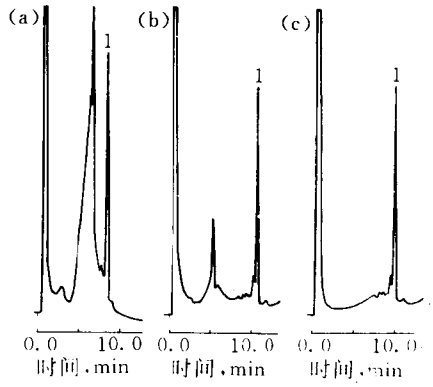


图 8－9　蛋清中分离溶菌酶最佳条件的选择

色谱柱：5μm 弱阳离子交换柱（CBX，4.6×50mm）

流量：1.0ml/min；检测器：UV280nm；进样体积：100μl

流动相：缓冲液（Ⅰ）

(a)　10mmol/L 2－*N*－吗啉乙烷硫酸盐，pH5.6；

(b)　10mmol/L 磷酸钾盐　pH7.0；

(c)　25mmol/L 磷酸钾盐　pH7.0

缓冲液（Ⅱ）

(a)　2.0mol/L 醋酸钠　pH7.0；

(b)和(c)　500mmol/L 磷酸钾　pH7.0；

线性梯度：0%→100% 缓冲液Ⅱ（15min）

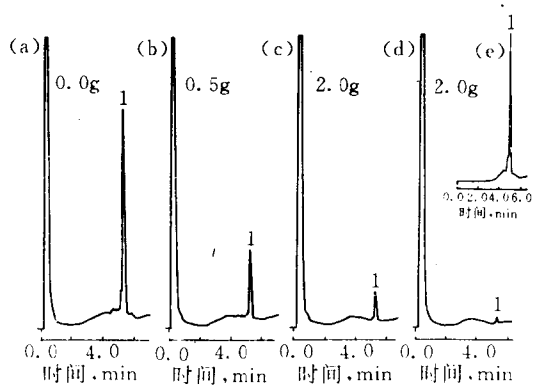


图 8－10　用 40μm 弱阳离子交换填料萃取蛋清中溶菌酶后，蛋清中溶菌酶残留量的测定

(a)　原始蛋清样品中溶菌酶（峰 1）的含量；

(b)　加入 0.5g 填料后溶菌酶在蛋清中的含量；

(c)　加入 2g 填料后溶菌酶在蛋清中的含量；

(d)　再加入 2g 填料后溶菌酶在蛋清中的含量；

(e)　40μm 弱阳离子交换填料萃取了溶菌酶后洗脱的馏份在图 8－9(c)色谱条件下测得的溶菌酶纯度

大规模蛋白质的分离在 40 年代前主要靠溶解度的不同，利用盐浓度、pH 值、加入有机溶剂等改变蛋白质的溶解度，使之得到分离。在 40 年代超离心分析技术的发展使蛋白质的分离得到了改进，由于蛋白质分子量可以用超离心分析测定，因而可以测定混合物中的组份及其比例，但是由于规模有限，仍不能大量制备。以后发展的逆流萃取技术虽可较大规模分离蛋白质，但由于重复萃取，很容易使它们变性。50～60 年代电泳的发展使人们致力于用它来分离纯化蛋白质，但由于热效应无法解决而使电泳仍停留在分析规模。60 年代制备规模液相柱色谱技术的出现大大改变了蛋白质分离的面貌，但由于当时限于凝胶过滤技术，填料颗粒大、强度低，只能在低压下使用，所以分离与纯化效率一直不高。到 70 年代中期，HPLC 迅速发展及一系列不同分离机理方法的出现，如疏水作用、反相离子对、离子排斥、免疫亲和等，更进一步丰富了蛋白质的分离与纯化手段，使之适用于不同类型的分离。但是大多数制备分离仍停留在线性色谱范畴，只是把分析色谱的参数简单加以放大作制备分离，所以固定相利用率低，产率不高。80 年代非线性色谱理论的发展从根本上改变了色谱技术在分离与纯化生物大分子中的应用，大

大提高了固定相的利用率，使近代色谱柱的高效分离能力得到了进一步的发挥。

非线性色谱分离与纯化蛋白质有 3 种展开方式。由于前沿分析与置换色谱要清洗再生后才能进行下一步分离，不如洗脱分离那么方便，不需任何其它步骤，在一次分离后可直接进行下一次分离，所以前沿分析很少在复杂体系中使用，通常配合超载洗脱或置换色谱一起进行。下面的应用实例以这两种展开方式为基础。

Berkowitz 等人[12]提出了一种用硅胶为基体的固定相超载洗脱展开来分离纯化蛋白质的三步分离技术。生物大分子特别是蛋白质在硅胶作基体的柱上进行分析测定时很容易发生不可逆吸附，甚至堵塞填料空隙，得不到重复的分析结果。特别是用原始粗产物进行分析时更容易发生此类现象。这种情况在制备分离纯化中，随着进样体积及浓度的增加更为加剧。对于目前仍然十分昂贵的高效色谱柱来说要绝对避免这种现象，为此第一步采用了细颗粒（3～5μm）的短柱（5cm）用来摸索分离样品的实验条件。短柱的优点是分离速度快，容易变换操作条件，特别适合于考察各种操作因素（如 pH 值、离子强度、有机溶剂等）对分离的影响，而且相对较经济。即使色谱柱发生污染也容易清洗。由于这种短柱与常规柱（ϕ4.6×250mm）性能相仿，所以能很快提供是否可能并值得用较便宜的粗颗粒作大规模分离与纯化或需要改变操作条件作进一步探索的信息。此外由于操作压力低，柱内固定相及柱连结部件也不容易损坏。图 8－9 表示这种 5cm 短柱快速选择蛋清中分离溶菌酶的最佳条件，实验结果证实色谱图（c）的条件最为理想。第二步采用较便宜的粗颗粒（40μm）填料直接加入样品溶液中进行分批萃取或填充制备柱来进行较大规模的原始粗产物的初步纯化。由于硅胶基体固定相的机械强度高，允许在高压下使用，所以尽管柱尺寸加以放大，仍可使用较大的流速，使粗产物得以快速分离，也很容易使系统重新平衡。加上这种 40μm 颗粒的填料与常规制备 LC 的填料相比仍要细些，而且分布很窄，所以比普通的 LC 制备柱要高。图 8－10 展示了用 40μm 弱阳离子交换填料分批加入蛋清溶液萃取溶菌酶后，溶液中残留的溶菌酶含量。处理 80ml 蛋清溶液，只需 4.5g 填料就可基本萃取干净，而且所得的溶菌酶具有相当的纯度，如图中 8－9（e）所示。第三步仍采用细颗粒（3～5μm）的均匀填料填充的色谱柱作最后的精制。由于填料细而均匀，所以柱效很高，特别适合于最终的纯化。这是由于①经过初级纯化，除掉了初级品中杂蛋白等容易堵塞柱子及降低柱寿命的因素，提高了精制柱的容量。②初级纯化后的体积大大减少，避免了精制柱在过分超载情况下使用，缩短了进样时间，从而使精制过程能在高效条件下进行，保证了终产物的纯度。③初级纯化中未除掉的蛋白质，其物化性能往往与目标产品极相似，而且必须要用高效柱才能除去。图 8－11 表示经第二步从原始蛋清中萃取的溶菌酶在疏水作用柱上进一步纯化的结果，纯度可超过 99%。Berkowitz 等人采用这种三步技术，还从牛脑萃取物中分离了 Calmodulin（一种与钙结合的蛋白质）。超载洗脱分离与纯化蛋白质还有一系列的报道也是目前在制备 HPLC 中用得最多的一种。由于篇幅有限，不一一介绍。

置换展开技术在生物大分子分离与纯化中的应用于 80 年代初由于 Horvath 等人[13]的工作得到了很大的发展。与超载洗脱相比，它能在更大程度上充分发挥高效固定相填料的分离能力，所以它能在普通的分析柱上一次分离几十至几百毫克的样品。而且只要找到合适的分离条件，样品在分离过程中不但不会稀释，甚至可以得到浓缩，从而大大减少了后处理的过程。当然也要防止由于溶解度的限制，使固体析出，堵塞填料颗粒。他们曾经在普通 C_{18} 的分析柱上一次进样 30mg，用溴化铵的取代物（BMDA）作置换剂，成功地从原始初产品中提纯了促黑激素的两个异构体 α 与 β，如图 8－12 和图 8－13 所示[14]。由于它们在固定相上的吸附等温线呈 S 形，

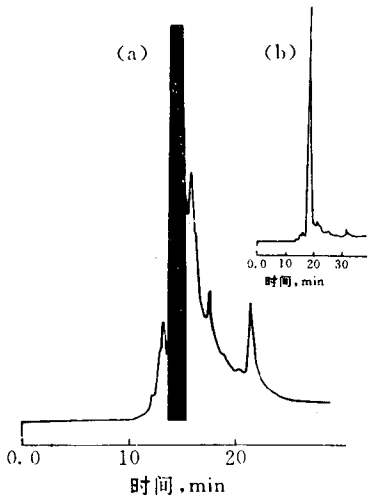


图 8－11　经 40μm 弱阳离子填料分离后的溶菌酶溶液进一步用疏水作用柱纯化，收集图中深色部分的馏份，溶菌酶纯度大于 99%

色谱柱：5μm 大孔 H1－Propyl 柱（内径 7.75×100mm）

流动相：缓冲液 A：2.0mol/L 硫酸铵
＋25mmol/磷酸钾　pH7.0

缓冲液 B：25mmol/L 磷酸钾　pH7.0

线性梯度：30min 内缓冲液 B 从 25%→100%

流量：1.0ml/min；检测器：UV280nm

进样量：2.5ml

图(b)表示图(a)样品灵敏度低 4 倍的情况

表 8－7　置换展开分离和纯化多肽的蛋白质

化合物	固定相	流动相	置换剂	柱尺寸 mm	进样量 mg	文献
β-乳球蛋白	DEAE－5PW Synchropak AX－300；DEAE Spherogel－TSK(10μm)	0.2 mol/L KH_2PO_4 (pH6.0)	1%乙酰基葡聚糖(CMD)	45×2.1	12.8	18
β-乳球蛋白	TSK－DEAE－5PW(10μm)	0.025 mol/L 硫酸盐缓冲液 (pH7.0)	10μl/ml 硫酸软骨素	75×7.5	100	17
卵清蛋白 α-乳清蛋白 大豆胰蛋白酶抑制剂	DEAE－5PW	0.02 mol/L Tris-磷酸盐	1% CMD	75×7.5	25	19
肽	Amicon－ODS	0.2 mol/L 硫酸缓冲液	40g/L 丁氧·乙氧基乙醇	250×4.6	1.2mol/L	20

所以置换剂的浓度的选择至关重要，否则将导致整个实验的失败[15]。他们还在 TSK DEAE－5PW 色谱柱(7.5×75mm)上用硫酸软骨素为置换剂，一次进样 100mg，成功地分离了 β-乳球蛋白 的两个异构体 A 和 B，回收率高达 95%[16]，如图 8－14 所示。他们还利用置换色谱结合其它展开方式，使蛋白质的分离与纯化在普通分析柱上进行得更方便合理。例如首先用前沿分析来输入样品，随后用置换展开或分步解吸来分离，这样可以使进样量从 100mg 提高到 152mg。用类似的方法在 C_4 反相柱上(Φ1×200mm)一次进样 52.5mg，成功地分离了人体生长激素的初产品。由于该产品十分昂贵，未做更大量试验，如果换算到普通分析柱(Φ4.6×

250mm)，那么一次纯化量即可高达 1364mg[17]。除了 Horvath 实验室外，其它还有一些报道用置换展开技术分离多肽和蛋白质，表 8－7 概括了近年来文献上报道的结果。

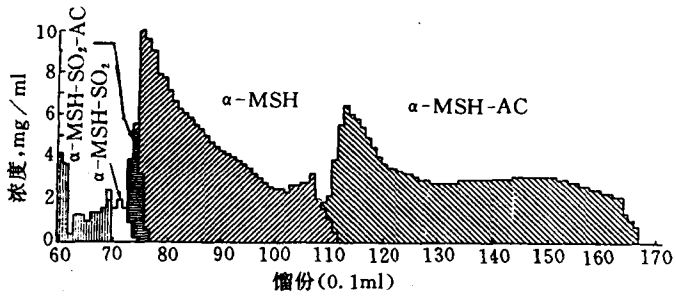


图 8－12　α－MSH 的置换展开色谱图

色谱柱：　5μm KV－ODS (内径 4.6×250mm)

流动相：　甲酸(0.25%)、三乙胺(0.5%)、乙腈(19%)的水溶液

置换剂：　50mmol/L BMDA

流量：　0.1ml/min；温度：22℃；馏份收集体积：0.1ml

进样量：　35mg 粗 α－MSH 混合物

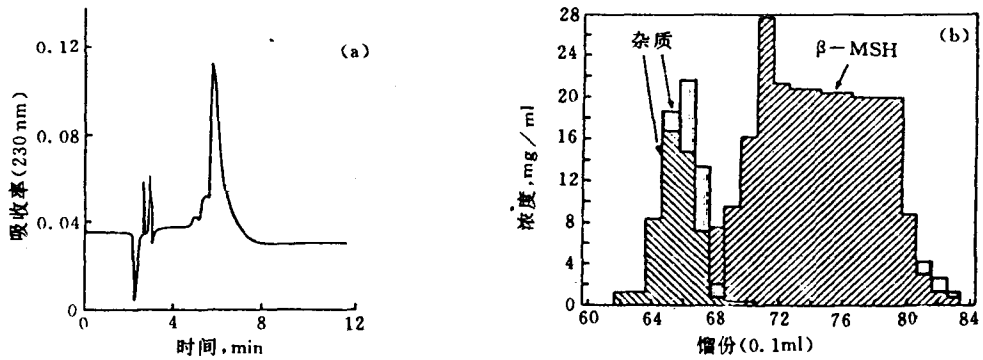


图 8－13　β－MSH 在同一 ODS 分析柱上置换展开纯化与分析测定的比较

(a)　纯化前 β－MSH 原料的分析结果

色谱柱：同图 8－12；流速：1ml/min；温度：22℃

流动相：溶剂 A：0.25%甲酸与 0.5%三乙胺的水溶液

溶剂 B：乙腈

线性梯度：2.5min 内 B 从 25%增加到 43%

进样量：20μg

(b)　β－MSH 原料的置换色谱图

流动相：0.1%三氟醋酸水溶液

进样量：30mg

其余条件同图 8－12

非线性色谱在生物大分子分离与纯化中的应用近年来得到了迅速的发展，它不但效率高、速度快，而且比传统线性色谱技术能更大限度地利用固定相的潜在分离能力，从而使生物产品的分离与纯化能在低耗高产的优化条件下进行。根据分离对象的不同，可以使用 3 种不同的展开方式或它们的有机组合。如果体系不复杂、目标产物的保留值在样品各组份中最小，那么前沿分析通常是最佳的选择，此时可以大量进样，杂质保留在柱内，流出的即是纯的目标产物。如果分离指数很小，那么一般要用置换展开技术，因为它特别适合于多组份、性质相近物质的分

离。若分离指数很大，则梯度洗脱或分步脱附往往更有效。从工业规模考虑，也许分步脱附比梯度洗脱更为方便可行。由于生物大分子在液固界面上的吸附行为随浓度变化很大，因而通常在分析色谱中浓度较低情况下测得的数据不能简单地应用到非线性色谱中。与线性色谱相比，无论在理论上还是实践方面非线性色谱还处在幼年时期，很多方面还有待我们进一步去研究与开发。

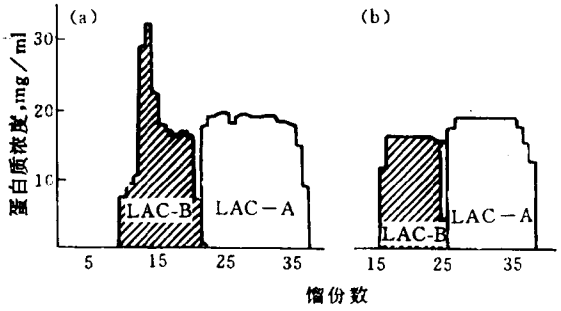


图 8－14　β-乳清蛋白异构体 A 和 B 的置换色谱分离

色谱柱：　TSK DEAE 5－PW（内径 7.5×75mm）
流动相：　25mmol/L 磷酸盐　pH7.0
置换剂：　10μl/ml 硫酸软骨素
流　量：　0.1ml/min；　温度：22℃；
馏份体积：　200μl；　样品管容积 4.0ml
负载量：　(a)100mg；(b)78mg

参考文献

1　J. Bonnerjea, S. Oh, M. Hoare, and P. Dunnill, Bio/Tech. 4, 954, (1986)

2　M. Ratafia and J. Keenan, ABL (11/12), 40, (1986)

3　G. Guiochon et al., Talanta 36, (1/2), 19, (1989)

4　J. Conder and J. Young "Physico—Chemical Measerement by Gas Chromatography" p. 353 Wiley, New York, (1979)

5　J. Huang Ph. D. Thesis, Yale University, 1987

6　J. Huang and Cs. Horvath, J. Chromatogr. 406, 275, (1987)

7　J. Huang and Cs. Horvath, J. Chromatogr. 406, 285, (1987)

8　H. Rhee, R. Aris and N. Amundson, Phil. Trans. Roy. Soc. A267, 419, (1970)

9　H. Rhee, R. Aris and N. Amundson, Chem, Eng. Sci., 29, 2049, (1974)

10　J. Huang and G. Guiochon, J. Colloid & Interface Sci., 128, 577, (1989)

11　S. Ghodbane, J. Huang and G. Guiochon, Anal. Chem., 63, 1147 (1991)

12　S. Berkowitz er al., Amer. Lab. 19, 33, (1987)

13　Cs. Horvath, in F. Bruner (ed.) The Science of Chromatography (J. Chromatogr. Library Vol. 32) Elsevier p 179 (1985)

14　G. Viscomi, S. Lande and Cs. Horvath, J. Chromatogr. 440, 157, (1988)

15　J. Frenz and Cs. Horvath in Cs. Horvath (ed.) High Performance Liquid Chromatography Advances and Perspectives Vol. 5, Academic Press p 211 (1989)

16　A. Liao, 2. El Rassi, D. Lemaster and Cs. Horvath, Chromatographia 24, 881, (1987)

17　A. lee, A. Liao and Cs. Horvath, J. Chromatogr. 443, 31, (1988)

18　A. Torres, B. Dunn, S. Edberg and E. Petersor, J. Chromatogr. 316, 125, (1984)

19　A. Torres, S. Edberg, and E. Elbert, J. Chromatogr. 389, 177, (1987)

20　S. Cramer, Z. El Rassi, and Cs. Horvath, J. Chromatogr. 394, 305, (1987)

第九章　凝胶过滤及离子交换层析介质

王佳兴

（化学工业部晨光化工研究院成都分院，成都，610041）

第一节　概　述

液相色谱法是生物技术中分离纯化的一种重要方法，在多肽、蛋白质的分离纯化工艺中早已获得应用。近年来它又在分子生物学中显示出优异的性能，在生物工程下游技术中发挥越来越重要的作用，它已走出实验室投入到大规模的工业化生产中。目前液相色谱法在生物技术工业的广阔范围内已成为一有力且高效的分离纯化工具。

随着生物技术的发展出现了许多以柱层析为基础的系统装置。1982 年出现了快速蛋白液相色谱系统 FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography)[1,2]。这是为纯化各种生物分子而设计的专用系统，用该系统纯化的生物物质已超过 400 种。FPLC 采用凝胶过滤、离子交换、等电聚焦、亲和层析、疏水色谱等多种色谱技术对种类繁多的生物大分子进行分离纯化[3~7]。

随着应用规模的不断扩大，瑞典 Pharmacia 公司在 FPLC 基础上又推出了中试层析系统 BioPiLot。这是一个完备的自动化先进系统，将实验室的纯化方法有效地发展至大规模生产上，它能在数小时内生产克级的高纯物质，进样量可达 20L，适用于生产小量或用于临床试验的产品。BiopiLot 是一高自动化系统[8]。

为使生物产品生产过程处于最佳管理状态，达到世界卫生组织(WHO)的标准，又出现了全自动生产规模层析 BioProcess 标准系统[9]。该系统的最大特点是其核心部分(即层析分离单元)能“就地清洗”，保证了系统能在无菌条件下工作，且清洗方便。此系统可进行公斤级生产。为满足中试及大规模生产的不同要求，它有 BioProcess Ⅰ及 BioProcess Ⅱ两种型号，其流速分别为 4～20L/h 及 40～400L/h。

除上述新系统外，由于加强了基础研究，还出现了“超级吸附分离”新工艺及径向色谱柱等新设备，大大提高了装置的生产能力及分离介质的利用率，因此年处理量为几万吨乃至十几万吨的层析分离装置已被采用。根据基本原理区分的各层析法各具特色(见表 9-1)，往往几种方法配合使用能得到最佳效果。

在液相色谱中，无论是哪一种层析方法，分离介质的性能都是分离效果的首要决定因素。经典的凝胶层析介质性能不断改进，已成为具有高通透性、高分辨率、高机械强度的新型凝胶过滤介质。具有新型功能基的离子交换剂、螯合介质已用于生化领域，特种离子交换剂——缓冲离子交换剂用于聚焦色谱，亲和层析的基体种类日益增多。国际上，瑞典的介质更新换代，推出一代新的 BioProcess 凝胶；美国、日本、德国等设计研制的各具特色的新型介质不断涌现。层析介质的发展趋势可以认为是对以天然大分子为母体的层析介质不断地进行合成工艺改进，提高性能，使老产品更新换代；同时大力开发以合成高聚物为骨架的具有优异性能的新一

代产品，层析介质在80年代出现了一个新的飞跃。目前用于生化分离的层析介质品种型号已达一百多种，本文仅简介其中凝胶过滤介质及离子交换介质两大类。

表9-1 适用于大规模生物分子纯化的色谱方法

特 点	分离方法	特 点	应 用
根据分子大小	凝胶过滤	(1)在分级方法中分辨率为中等，但对脱盐效果优良 (2)流速较低，对分级每周期约≥8h，对脱盐仅30min (3)容量受样品体积局限	适用于大规模纯化的最后步骤，在纯化过程的任何阶段均可进行脱盐处理，尤其适用于两种缓冲液交替时
电 荷	离子交换	(1)通常分辨率高(usually high) (2)选用介质得当时流速快、容量很高，样品体积不受限制	最适用于大量样品需处理、分离的前期阶段
等电点	聚焦色谱	(1)分辨率很高(Very high) (2)速度快 (3)容量很高，但柱的大小限制样品体积	适用于纯化的后阶段
疏水性	疏水作用	(1)分辨好(good) (2)流速很快 (3)容量高，样品体积不受限制	适用于分离的任何阶段，尤其是样品离子强度高时，即在盐析、离子交换或亲和层析之后用
亲和性	亲和色谱	(1)分辨率非常好(excellent) (2)流速很高，样品体积不受限制	适用于任何阶段尤其是样品体积大、浓度很低而杂质含量很高时

第二节 凝胶过滤介质

一、凝胶过滤

凝胶过滤(Gel filtration)是利用凝胶的网状结构根据分子大小进行分离的一种方法。其基本原理是含有尺寸大小不同分子的样品进入层析柱后，较大的分子不能通过孔道扩散进入凝胶珠体内部，而与流动相一起先流出层析柱。较小的分子可通过部分孔道、更小的分子可通过任意孔道扩散进入珠体内部。这种颗粒内部扩散的结果，使小分子向柱下的移动减慢，从而样品根据分子大小的不同依次顺序从柱内流出达到分离的目的。凝胶象分子筛一样，将大小不同的分子进行分离，因此凝胶过滤又叫分子筛层析或称尺寸排阻色谱[10,11](Size-exclusion Chromatography)。

凝胶过滤具有许多优点：介质为不带电荷的惰性物质，不与溶质分子作用，因此分离条件温和，蛋白质收率高，重现性好；工作范围广，分离分子量的覆盖面大，可分离从几百到数百万分子量的分子；设备简单、易于操作，周期短，每次分离之后不需再生故而可连续使用，有的已连续应用几百次甚至达千次。这些优点使凝胶过滤已成为一种通用的分离方法，在生化产品的制备技术中已获广泛应用。

凝胶过滤主要有脱盐与分级分离两大用途。脱盐是分离大小两类不同的分子即无机盐与

生物大分子的；分级是将分子大小相近的物质分开，通常为大分子间的分离。目前凝胶过滤不但用于实验室，在大规模生产中也能承担重任，30min 内可处理 500L 样品。脱盐工艺中凝胶介质体积通常为样品体积的 4～5 倍，流速可达 200cm/h 左右。用于分级分离时必须选用孔径适当、分离范围与样品分子大小相适应的凝胶，上样量少，仅为床体积的 5%～10%，因此这种分离常用于经过浓缩后的样品。柱的加长可提高分离效果，但对操作不利。在大规模分离中采用“叠式柱”(Stack system)，将几个不高的柱叠加起来，其易于操作，流速为同样体积常规柱的 4～5 倍，且不影响分离效果。

二、凝胶介质应具备的条件

凝胶过滤是生物化学中应用最广泛的分离纯化技术之一，它具有设备简单、易于操作、活性物质回收率高、重现性好等优点。凝胶过滤介质的性能是获取上述优点的基本保证，凝胶介质应具备以下条件。

第一，介质本身为惰性物质，在应用过程中它不与溶质、溶剂发生任何作用。

第二，应尽量减少介质内含的带电离子基团，以减少非特异吸附性，提高蛋白质的收率。但由于绝大部分的多糖类骨架中都或多或少地含有一些带电基团(如羧基)等，这些基团在低离子强度时对带电荷的溶质发生作用，将带正电的物质滞留产生非特异吸附。对大多数分子而言，采用离子强度大于 0.02mol/L 的缓冲液即可消除这种效应。

第三，介质内孔径大小要分布均匀，即孔径分布较窄，在分级分离中这点尤为重要。

第四，凝胶珠粒大小均匀，即粒径分布窄。为提高柱效，根据实验目的及条件选用适合的粒径。细粒径分辨率高但流速慢，粗粒径适用于高流速、低压色谱及间歇操作。

第五，介质要具有优良的物理化学稳定性及较高的机械强度以增加使用寿命。

凝胶过滤介质在各种分离介质中占有特殊的地位。由于它有上述优点、能满足生化分离的基本要求，将其经化学改性可衍生出种类繁多的层析介质，可以制备各种离子交换剂及缓冲离子交换剂，可以制备疏水色谱介质及螯合介质，可以作为亲和层析吸附剂的载体。因此可认为凝胶过滤介质是各种层析介质的母体，所以研制新的凝胶过滤介质、提高改进这类介质的性能有广泛的意义。

三、凝胶过滤介质的种类

凝胶过滤介质的骨架主要分为天然多糖类及合成大分子两大类。

1. 多糖类骨架的介质

多糖类主要为纤维素、葡聚糖及琼脂糖等。以天然多糖为母体的凝胶过滤介质是“经典”的分离生物大分子的材料。这类介质具有亲水性及与生物大分子的相容性，可允许生物大分子透过而不发生变性。这类介质原多为软基质，压力降大，不易操作。近年来合成工艺不断改进，生产出刚性、半刚性的骨架，出现了适用于高流速且具有高分辨率的新产品以满足生产规模的需求。除单一的多糖骨架外还出现了琼脂糖与葡聚糖接枝而成的复合凝胶 Superdex 高效过滤介质[12,13]。新一代介质的出现，提高了生产效率，从小规模过滤发展成为工业生产应用。这类以多糖为骨架的介质虽然“古老”，但由于性能不断改进，老产品更新换代，进一步发挥了其“活力”，故仍是目前生化分离中应用最广、数量最多的凝胶过滤介质。

2. 合成大分子骨架的介质

吸取多糖类骨架亲水性优点，克服其易受微生物侵蚀的缺点，开展了合成有机大分子骨架的研究，选用高亲水性单体经共聚反应并控制孔结构出现了一些合成骨架的介质。除应用多年

的聚丙烯酰胺类之外，80年代还出现了聚乙烯醇系及含羟甲基酰胺类的新型介质，且已商品化。[14,15]。

3. 由天然大分子与合成高聚物构成混合骨架的介质

这种骨架既可增加介质的刚性，又使介质具有与生物大分子的相容性，这是第三类骨架。表 9－2 列出主要凝胶过滤介质的牌号及骨架结构。

表 9-2 凝胶过滤介质主要产品牌号及骨架结构

牌　号	骨架类型	生产单位	备　注
Sephadex	葡聚糖	Pharmacia(瑞典)	衍生物：Sephadex LH 系 Sephasorb HP 系
Sepharose	琼脂糖	Pharmacia	主要系列：Sepharose Sepharose CL Sepharose High performance Sepharose FF（离子交换剂系） Superose
Bio-Gel A	琼脂糖	Bio Rad(美)	
Superdex	琼脂糖-葡聚糖	Pharmacia	
Bio-Gel. P	聚丙烯酰胺	Bio Rad	
Sephacryl	葡聚糖-聚丙烯酰胺	Pharmacia	改进产品：Sephacryl HR 系
Ultrogel	琼脂糖-聚丙烯酰胺	Pharmacia	
Trisacryl	聚羟甲基酰胺类	Pharmacia	
Fupergit C	聚丙烯酰胺系	德　国	骨架内还有环氧基
Toyopearl	聚乙烯醇系	Toso Hass (美日联合企业)	
Bio-Beads S-X	聚苯乙烯系	Bio Rad	

第三节　凝胶过滤介质的主要品种

一、葡聚糖系

牌号　Sephadex[16～17]。

1. 结构

Sephadex 是以氯代环氧丙烷进行交联的葡聚糖珠状凝胶，结构如图 9-1 所示。交联程度影响凝胶的孔结构。依据孔径不同形成 G 型凝胶的系列产品，表 4-3 列出葡聚糖凝胶的型号及基本性能，G 后数字越大表示孔径越大，排阻极限亦越大。

2. 性能

（1）溶胀性　Sephadex 系均以干态供应，使用前必须在过量的溶剂中充分溶胀，沸水浴可加速溶胀，但要避免剧烈搅拌以防破碎。

该系在有机溶剂中及在水中的溶胀程度不同。

(2) 化学稳定性　Sephadex 不溶于一切溶剂，在水、盐溶液、有机溶剂、碱和弱酸溶液中均较稳定。因糖苷键在强酸中可发生降解作用，所以只能接触强酸的稀溶液，在 0.1mol/L 盐酸中 1～2h，在 0.02mol/L 盐酸中经 6 个月均无明显变化。要避免使用氧化剂。

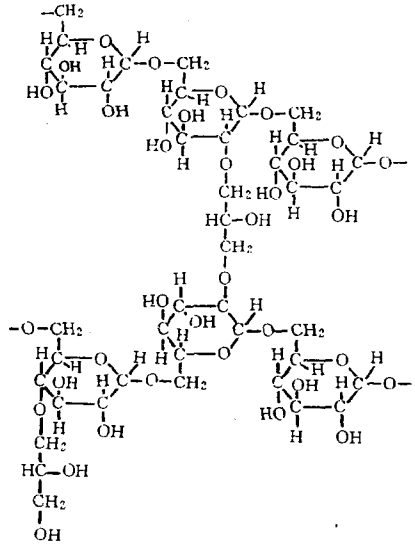


图 9-1　Sephadex 结构图

(3) 物理稳定性　pH 中性湿态珠体可经受 120℃、30min 高压灭菌而不影响色谱性能。

(4) 机械强度　Sephadex 凝胶的机械强度取决于交联度。高交联度的凝胶(如 G10、G15)为刚性的，G25 及 G50 亦能承受一定压力，这几种型号凝胶的流速均与压力降成正比，服从 Darcy 定律。

$$V=\frac{K\cdot\Delta P}{L}$$

式中　V——线速度，cm/h；

ΔP——压力降，cm 水柱①；

L——床高；

K——比渗透率，受粒径影响较大。

根据实验条件及表 4-3 中列出的 K 值，可计算出流速。

3. 主要用途

孔径较小的凝胶(如 G10、G15、G25、G50)主要用于脱盐、肽与其它小分子的分离；孔径较大的凝胶用于蛋白质与其它大分子的分离。

DNA 级的 Sephadex 适用于 DNA 或低聚核苷酸分离。

4. 衍生系

Sephadex LH 系

在葡聚糖结构中引入羟丙基就成为 LH 系列产品。以 G25 为母体的衍生物为 LH20，以 G50 为母体则为 LH60。经改性后 LH 系介质具有更广泛的用途，适用于脂类、甾类、脂肪酸、激素、维生素及其它小分子的分级分离。这类介质除水溶液外，还适用于极性有机溶剂及水-有机溶剂的混合液中。

① 1cm 水柱压力为 98.1Pa。

LH 系列主要用途：(1)用于有机溶剂中的凝胶过滤；(2)广泛用于吸附色谱及分配色谱，适用于其它凝胶难以处理的样品；(3)排阻极限与原母体凝胶相同。LH20.对芳香多环化合物的吸附能力大于 LH60，而 LH60 因为有较大的固定相体积而更适用于分配色谱。

Sephasorb HP Uitrafine

该产品也是羟丙基化衍生物，交联度高，粒径分布窄(10～23μm)。由于它的刚性及狭窄的粒径范围，使其既可用于中低压液相色谱，也可用于 HPLC；由于它的选择性及惰性，使其可广泛用于有机小分子(如醛、酮、酚、核苷酸等)的分离；又因其为中等极性，所以既可用于正相色谱，也可用于反相色谱。

该系性能参见表 9-3。

二、琼脂糖系

琼脂糖系凝胶都是由经过纯化的琼脂糖制备的，其中仅含有极少的带电基团。利用琼脂糖热溶液冷却时可凝胶化的特点，可较方便地制成珠状物。在凝胶过程中由单独的多糖链先形成双螺旋，然后聚集成胶束(如图 9-2 所示)。胶束之间产生了孔，孔的大小取决于胶束的多少，即琼脂糖的浓度。采用不同浓度的琼脂糖溶液，成球后可得到不同孔径的珠状凝胶。琼脂糖系凝胶有两种牌号，分述如下。

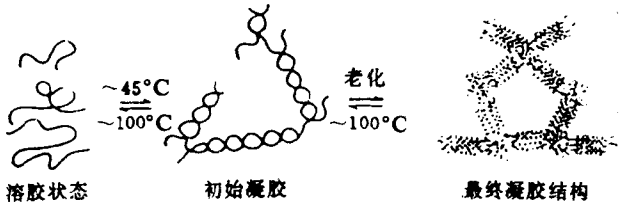


图 9-2 琼脂糖凝胶结构

1. Bio-Gel A 系[18]

Bio－Gel A 系是美国 Bio-Rad 公司的产品，为非交联琼脂糖凝胶，受热时凝胶解体，使用温度范围 2～30℃，适用 pH 范围 4～13，其主要性能见表 9-4。

2. Sepharose 系[19～25]

Sepharose 系是目前生化分离专用介质中型号最多、应用最广的最大家族。其合成工艺不断改进，换代产品不断出现，性能日益完善。表 9-5 列出 Sepharose 系品种及性能。

(1) Sepharose　Sepharose 是该系中最早的产品，为非交联结构，因此不能高压灭菌，仅用于 2～40℃。根据琼脂糖含量不同有 3 种型号，含量为 2%、4%、6%的分别命名为 2B、4B 及 6B。

(2) Sepharose CL　superose CL 是琼脂糖珠体与 2,3－二溴丙醇反应后具有共价交联键的产物。交联结构大大提高了珠体的热稳定性及物理化学稳定性，对孔结构无明显影响。交联后凝胶在还原条件下经碱水解以去除硫酸根，减少带电基团，因此这类介质的非特异吸附性比其母体更小。这种凝胶在中性条件下可经 120℃消毒，其色谱性能不变。其对应于原母体的命名为 CL－2B、CL－4B 及 CL－6B。Sepharose CL 除用于凝胶过滤外，还广泛用作离子交换剂及亲和吸附剂的母体。

表 9-3 Sephadex 型号及主要性能

型号	干态粒径 μm	分级范围 球蛋白	分级范围 葡聚糖.	适用pH范围	溶胀体积 ml/g(干)	溶胀时间,h 20℃	溶胀时间,h 90℃	水力学性能			应用情况
G10	40～120	700	700	2～13	2～3	3	1	K: 19	流速服从 Darcy 定律		(1)适用于脱盐
G15	40～120	1500	1500	2～13	2.5～3.5	3	1	18	K 为比渗透率		(2)适用于肽及小分子分离
G25	粗 100～300	1000～5000	100～5000	2～13	4～6	3	1	290			
	中 50～150							80			
	细 20～80							30			
	超细 10～40							9			
G50	粗 100～300	1500～30000	500～10000	2～10	9～11	3	1	400			
	中 50～150							145			
	细 20～80							36			
	超细 10～40							13.5			
								最大操作压力 kPa	最大流速① ml/min	最大流速① $\frac{ml}{cm^2 \cdot h}$	
G75	40～120	3000～80000	1000～50000	2～10	12～15	24	3	15.69	6.4	77	适用于蛋白质分离
	超细 10～40	3000～70000							1.5	18	
G100	40～100	4000～150000	1000～100000	2～10	15～20	72	5	9.41	4.2	50	
	超细 10～40	4000～100000							1.0	12	
G150	40～100	5000～300000	1000～150000	2～10	20～30	72	5	3.53	1.9	23	适用于多肽及蛋白质分离
	超细 10～40	5000～150000			18～22				0.5	6	
G200	40～100	5000～600000	1000～200000	2～10	30～40	72	5	1.57	1.0	12	
	超细 10～40	5000～250000	1000～150000		20～25				0.25	3	
LH-20	基本性能同 G25。适用于脂类、甾类、脂肪酸、激素、维生素等分离。适用 pH 范围 2～13										
LH-60	基本性能同 G50。应用同上。有较高排阻极限。适用 pH 范围 2～10										
Sephasorb HP Ultrafine	排阻极限、分级范围同 G25。适用 pH 范围 2～13										

① 2.5×30cm 柱。

表 9-4 Bio-Gel A 系型号及性能

型号	湿态粒径 (目)②	μm	琼脂糖含量 %	分级范围 Daltons	核酸排阻极限 (碱基对)	线速度 cm/h
0.5m①	粗 50～100	150～300	10	<10 000 ～500 000	200	20～25
	中粗 100～200	80～150				15～20
	细 200～400	40～80				7～13
1.5m	粗 50～100	150～300	8	<10 000 ～1 500 000	750	20～25
	中粗 100～200	80～150				15～20
	细 200～400	40～80				7～13
5m	粗 50～100	150～300	6	10 000 ～5 000 000	2 000	20～25
	中粗 100～200	80～150				15～20
	细 200～400	40～80				7～13
15m	粗 50～100	150～300	4	40 000 ～1 500 000	7 000	20～25
	中粗 100～200	80～150				15～20
	细 200～400	40～80				7～13
50m	粗 50～100	150～300	2	100 000 ～50 000 000	20 000	20～25
	细 100～200	80～150				5～15
150m	粗 50～100	150～300	1	1 000 000 ～150 000 000	70 000	5～10
	细 100～200	80～150				2～5

① m 为 million 词头。 ② 美国标准筛。

(3) Superose 由珠状琼脂糖经两次交联而制备的新型凝胶为 Superose。琼脂糖先与含双环氧基及多环氧基的混合长链交联剂进行第一阶段交联，然后再与含双功能基的短链交联剂进行第二次交联得到产品。经两次交联后大大提高了介质的刚性，并进一步增强了其物理化学稳定性。用 0.1mol/L HCl 及 0.1mol/L NaOH 在 40℃处理两周，色谱性能无明显变化，还可经受 70%甲酸及 30%乙腈处理。

Superose 是适用于高流速的高效凝胶过滤介质，有 Superose 6 及 Superose12 两种型号，其中含琼脂糖分别为 6%及 12%。10μm 的细颗粒以预装柱出售，可用于 HPLC，其制备级可用于快速分离。该产品还衍生出 Protein A Superose、Protein G Superose 及螯合介质。

三、聚丙烯酰胺系[18]

Bio-Gel P 是丙烯酰胺与 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺共聚而成的亲水性凝胶，其中含有极少的游离电荷，羧基含量≤3.0 μmol/g 干胶，因此非特异吸附性很小。这类合成高聚物结构稳定、不受微生物侵蚀，120℃消毒 30min 性能不变。改变交联剂用量可控制不同孔径得到不同排阻极限的系列产品(见表 9-6)。

四、Sephacryl 系[25,26]

Sephacryl 凝胶是由烯丙基葡聚糖与 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺经共聚而制备的一种共价交联的刚性珠体，其结构如图 9-3 所示。

表 9-5 Sepharose 系品种性能

牌号	骨架结构		粒径(湿态)		pH适用范围	DNA排阻极限(碱基对)	分级范围		化学稳定性	物理稳定性	水力学性能①		
	琼脂糖含量 %	交联情况	范围 μm	平均 μm			球蛋白	葡聚糖			最大操作压力 kPa	最大流速 ml/min	最大流速 $\frac{ml}{cm^2 \cdot h}$
Sepharose 6B	6	未经交联反应，软基质	45～165		4～9	194	1×10^4～4×10^6	1×10^4～1×10^6	(1)避免氧化剂 (2)可长期用于盐酸胍及尿素等介质中	(1)适用于5～40℃，不能高温消毒 (2)软基质，流速低	19.61	1.16	14
4B	4		45～165			872	6×10^4～2×10^7	3×10^4～5×10^6			7.85	0.96	11.5
2B	2		60～200			1353	7×10^4～4×10^7	1×10^5～2×10^7			3.92	0.83	10
Sepharose CL									(1)氧化剂存在下多糖发生部分水解 (2)可用多种有机溶剂取代水，且孔径变化不大 (3)非特性吸附小于其母体	(1)可在pH7、120℃反复消毒 (2)流速比其母体高50%			
6B	6	共价交联结构	45～165		3～12	194	1×10^4～4×10^6	1×10^4～1×10^6			>19.61	2.5	30
4B	4		45～165			872	6×10^4～2×10^7	3×10^4～5×10^6			11.77	2.17	26
2B	2		60～200			1353	7×10^4～4×10^7	1×10^5～2×10^7			4.90	1.25	15

（续表）

牌　号	骨架结构		粒径(湿态)		pH适用范围	DNA排阻极限(碱基对)	分级范围		化学稳定性	物理稳定性	水力学性能①		
	琼脂糖含量%	交联情况	范围 μm	平均 μm			球蛋白	葡聚糖			最大操作压力 kPa	最大流速 ml/min	最大流速 $\frac{ml}{cm^2 \cdot h}$
Superose 12 制备级 12 6 制备级 6	12 12 6 6	经 两 次 交 联	20～40 8～12 20～40 11～15	10±2 13±2	2～14 2～14		1×10^3～3×10^5 5×10^3～5×10^6		(1)可经受0.2mol/L NaOH，0.01 mol/L HCl及1mol/L醋酸处理，短时间可用0.5mol/L HCl清洗 (2)1%SDS 8mol/L尿素及6mol/L盐酸胍不影响分离性质 (3)制备级可从水溶液转成有机溶剂 (4)离子强度>0.5mol/L时可忽略其吸附性	pH7，可经受121℃、30min消毒	二种介质预装柱 Superose 6HR10/30及 Superose 12HR 10/30 床体积 24ml 最大压力 1.5MPa 流速 0.5～10ml/min		

① 2.5×30cm柱。

表 9-6　Bio－Gel P(聚丙烯酰胺类凝胶)

牌　号	粒径范围(湿) (目)　μm	分离范围 Daltons	湿床体积 ml/g(干)	流速范围 线速度,cm/h	应　用
P-2	细　200～400　40～80 超细　～400　<40	100～1 800	3.5	10～15 5～10	适用于脱盐及分级分离,还广泛用于酶、糖蛋白纯化及血清蛋白、多糖、肽等分离、纯化
P-4	中　100～200　80～150 细　200～400　40～80 超细　～400　<40	800～4 000	5	15～20 10～15 5～10	
P-6	粗　50～100　150～300 中　100～200　80～150 细　200～400　40～80 超细　～400　<40	1 000～6 000	7	20～25 15～20 10～15 5～10	
P-10	粗　50～100　150～300 中　100～200　80～150 细　200～400　40～80 超细　～400　<40	1 500～20 000	9	20～25 15～20 10～15 5～10	
P-30	粗　50～100　150～300 细　100～200　80～150 超细　～400　<80	2 500～40 000	11	20～25 7～13 5～10	
P-60	粗　50～100　150～300 细　100～200　80～150 超细　～400　<80	3 000～60 000	14	10～15 4～6 2～5	
P-100	粗　50～100　150～300 细　100～200　80～150 超细　～400　<80	5 000～100 000	15	10～15 4～6 2～5	
P-200	粗　50～100　150～300 细　100～200　80～150 超细　～400　<80	30 000～200 000	25	10～15 3～6 2～5	
P-300	粗　50～100　150～300	60 000～400 000	30	2～4	

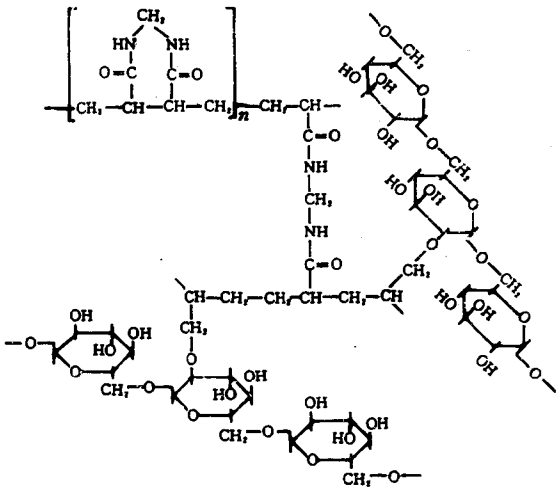


图 9-3 Sephacryl 结构

在 Sephacryl Superfine 的基础上推出粒径分布窄的具有高分辨率的凝胶过滤介质 Sephacryl High Resolution(HR)。这种亲水骨架具有最小的非特异吸附及最大的蛋白回收率，对分子量从 500 至 300～400nm 的大分子均可进行快速及高效凝胶过滤。这些优点使其具有应用的广泛性，不但用于研究还可用于工业生产；不但用于水溶液中，还可用于多种有机溶剂体系；不但可用于几微升样品的分离，还可处理几千升样品，且效果良好。这种高效分离介质每米床高可达 90000 理论塔板。Sephacryl 凝胶性能见表 9-7。

表 9-7 Sephacryl 凝胶性能

型 号	分级范围		DNA 排阻极限（碱基对）	粒 径（湿态）μm	适 用 pH 范 围	物理化学稳定性
	球蛋白	葡聚糖				
S-100 HR	1 000～100 000		—	25	3	(1) pH 及离子强度改变时，床体积变化极微
S-200 HR	5 000～250 000	1 000～80 000	118	〃	〃	(2) pH7，在 121℃可消毒 30min
S-300 HR	10 000～1.5×10^5	2 000～100 000	118	75	11	(3) 在 0.2mol/LNaOH、0.1 mol/LHCl、1mol/LHAc、6mol/L 盐酸胍、8mol/L 尿素、1%SDS、2mol/LNaCl、24%乙醇、30%丙醇、30%乙腈及各常用缓冲溶液中于 40℃保存 7 天，介质性能不变
S-400 HR	20 000～8×10^6	10 000～2×10^6	271			
S-500 HR	—	40 000～2×10^7	1078			
S-1000 SF	—	5×10^5～$>10^8$	20 000			(4) 贮存于 20%乙醇中，防止微生物侵蚀

五、Superdex 系[27]

Superdex 是最新的凝胶过滤介质，是将葡聚糖以共价结合到高交联的多孔琼脂糖珠体上

形成的复合凝胶。琼脂糖的高交联骨架为珠体提供了较高的物理化学稳定性，葡聚糖为介质提供了优良的选择性。图 9-4 为 Superdex 结构示意图。

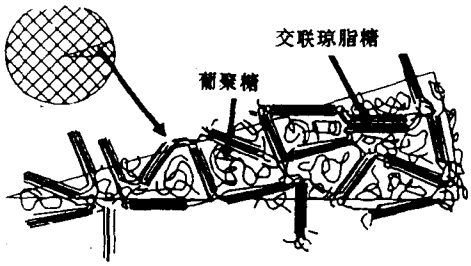


图 9-4　Superdex 结构

这类凝胶为刚性珠体，适用于高流速，且分辨率较高，制备级分离效率可达 15000～30000 塔板/m。粒径 24～44μm 的为制备级(Superdex prep grade)；其预装柱为 Hiload(高负荷)柱。Superdex HR 柱是粒径 13μm 细珠体的预装柱，这两种柱均用于 FPLC 系统中。

表 9-8 列出 Superdex 系列主要性能。

六、聚乙烯醇系

聚乙烯醇系 Toyopearl（トヲパール）[14,15]是以交联聚乙烯醇为骨架的凝胶过滤介质，80 年代初问世，是由美国 Rohm & Hass 公司与日本 Soda 公司的联合企业 TosoHass 开发研制的，近年来已流通于国际市场，我国一些单位也得到该系列样品。适用于 HPLC 的介质 Fractogel TSK 是该系列的类似产品。

表 9-8　Superdex 系性能

型　号	湿态粒径 μm	排阻极限（球蛋白）	分级范围		应　用	物理化学性能
			球蛋白	葡聚糖		
75	13	～100 000	3000～70 000	500～3000	预装柱 Superdex 75HR 10/30，适用于 FPLC 系统	(1)pH 适用范围 3～12 (2)pH7 时可经 120℃消毒处理 (3)在清洗中可用 1mol/L NaOH 及 0.1mol/L HCl 短时处理 (4)1%SDS、8mol/L 尿、6mol/L 盐酸胍等处理后，色谱性能不变 (5)在极低离子强度下才显示出微弱的非特异吸附性，通常应用条件下可忽略不计
75 (p.g.)	24～44				预装柱 Hiload 及大的 Biopilot 柱	
200 (p.g.)	24～44	—	1×10^4～6×10^5	1×10^3～1×10^5	适用于巨大分子量蛋白质分离，尤其适用于单克隆抗体分离	

Toyopearl 为多孔的三向网状结构，大分子链上含有丰富的羟基，骨架为高亲水性，还可进行化学改性而得到含有多种功能基的离子交换剂及亲和吸附剂的载体。该系凝胶与生物大分子有相容性，作为固定化生物催化剂载体已获广泛应用，有关该系列凝胶及离子交换剂的研究论文已近百篇。Toyopearl 系主要型号列入表 9-9。

Toyopearl 系主要性能：

（1） 具有优良的物理化学稳定性，不溶于水及有机溶剂，不受微生物侵蚀；

（2） 由于该系列为合成高聚物，纯度较高，大分子链中几乎无带电基团，其非特异吸附可忽略不计，蛋白回收率高；

（3） 该系为半刚性凝胶，适用于高流速、高生产效率的工业规模应用，有较长的使用寿命，120℃反复消毒，色谱性能不受影响。

表 9-9 Toyopearl 系主要型号

型 号	排阻极限		备 注
	球蛋白	葡聚糖	
HW40	1×10^4	7×10^3	（1） 各型号有不同的粒径分布，常注在型号后
HW50	8×10^4	2×10^4	S. Superfine 20～40μm
HW55	7×10^5	2×10^5	F. Fine 30～60μm
HW60	1×10^6	3×10^5	C. Coase 50～100μm
HW65	5×10^6	1×10^6	M. Medium 40～80μm
HW75	5×10^7	1×10^7	E. Extracoase 100～300μm
			（2） HW 的孔径为几百纳米，对 PEG 的排阻极限为 1×10^6

七、Ultrogel 系及 Trisacryl 系[28]

Ultrogel 系有 Ultrogel A 及 Ultrogel AcA 两种结构不同的型号。

Ultrogel A 是琼脂糖凝胶，琼脂糖含量为 2%、4%、6%的分别命名为 A2、A4、A6。

Ultrogel AcA 是聚丙烯酰胺与琼脂糖混合骨架的凝胶，它具有较窄的粒径分布及孔径分布，为刚性珠状凝胶，具有优良的化学物理稳定性。

Trisacryl 是一类含羟甲基酰胺系聚合物，为一种全合成的新型凝胶。该介质可看成是一个与生化试剂 Tris 结构相似的大分子链，也可看成是 Tris 的聚合体，具有较高的机械强度，适用于高流速。

Ultrogel 系及 Trisacryl 系主要产品型号列于表 9－10。

Ultrogel 与 Trisacryl 两系均为瑞典 LKB 公司的产品，自 LKB 并入 Pharmacia 公司之后已停产。

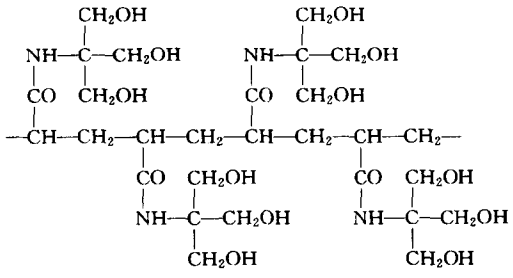


图 9－5 Trisacryl 结构

表 9－10　Ultrogel 系及 Trisacryl 系主要型号

牌号型号		粒径，μm	排阻极限	线型分子分级范围	效率，塔板/m
Ultrogel	AcA 202	60～140	22 000	1 000～15 000	5 000
	AcA 54	60～140	90 000	5 000～70 000	2 000
	AcA 44	60～140	200 000	10 000～130 000	2 000
	AcA 34	60～140	750 000	20 000～350 000	2 000
	AcA 22	60～140	3 000 000	100 000～1 200 000	2 000
Trisacryl	GF 05	40～80	3 000	200～2 500	2 500
	GF 2000	40～80	20 000 000	10 000～15 000 000	2 500

表 9－11　Bio－Beads S－X 系性能

型　号	二乙烯苯含量，%	粒径，目	分子分级范围	在基中体积，ml/g(干)
S－X1	1	200～400	600～14 000	9.8
S－X2	2	200～400	100～2 700	5.2
S－X3	3	200～400	～2 000	5.0
S－X4	4	200～400	～1 400	4.0
S－X8	8	200～400	～1 000	3.0
S－X12	12	200～400	～400	2.5

八、Bio－Beads S－X 系[18]

Bio－Beads S－X 系列是美国 Bio Rad 公司的产品，为多孔苯乙烯-二乙烯苯共聚物。其适用于疏水性物质及非水溶液。以二乙烯苯含量控制孔径，但也受洗脱剂的影响，在芳香族溶剂中其溶胀度大；排阻极限也增大，在醇类中，骨架不溶胀，孔径小，排阻极限也小。Bio－Beads S－X 系性能列于表 9－11。

第四节　离子交换法与离子交换剂的选择

一、离子交换法

离子交换法是通过带电的溶质分子与离子交换剂中可交换的离子进行交换而达到分离目的的方法。该法主要依赖电荷间的相互作用，利用带电分子中电荷的微小差异而进行分离，具有较高的分离容量。几乎所有的生物大分子都是极性的，都可使其带电，所以离子交换法已广泛用于生物大分子的分离纯化。由于离子交换法分辨率高、工作容量大且易于操作，它已成为蛋白质、多肽、核酸及大部分发酵产物分离纯化的一种重要方法，在生化分离中约有 75%的工艺采用离子交换法。

离子交换剂是一类能显示离子交换的功能高分子材料。功能基由固定在骨架上的带电基团与可进行交换的能移动离子两部分组成，二者所带电荷相反，以静电力结合。可进行交换的离子称为反离子或抗衡离子，这种反离子可与溶液中带同种电荷的离子进行交换反应。因离子交换反应是可逆的，在一定条件下被交换的离子可以“解吸”使离子交换剂又恢复到原来的离

子形式，所以离子交换剂通过交换和再生可以反复使用。

选择适当条件使一些溶质分子变成离子态，通过静电作用结合到离子交换剂上，而另一些物质不能被交换，则这两类物质即可被分离。带同种电荷的不同离子虽都可以结合到同一介质上，但由于各带电量不同，与介质的结合牢度不同，改变洗脱条件可依次被洗脱而达到分离的目的。

对生物大分子进行分离纯化可采用两种方式，一是将目的产物离子化，被交换到介质上，杂质不被吸附，从柱流出，称为“正吸附”。此法优点是目的产物纯度高，且可达到浓缩目的，宜处理目的产物浓度低且工作液量大的溶液。另一方式是将杂质离子化后被交换，而目的产物不被交换直接流出，这种方式称为“负吸附”。采用此法通常可除去50%～70%的杂质，适用于目的产物浓度高的工作液，但此方式的产物纯度不高。以上两种方式的选择要依据样品及具体要求而定。

离子交换法按操作方式可分为间歇式分批操作及柱式操作两种。间歇操作又叫静态处理，将离子交换剂浸泡于工作液中，达到平衡后，滤出介质进行洗脱。柱式操作又称动态法，交换、洗脱、再生等步骤均在柱内进行，亦称为离子交换色谱法(Ion Exchange Chromatography)。目前无论间歇操作还是色谱分离，离子交换法均已成为生物化学中一重要的分离方法，而且它还涉及到生物反应器及酶反应机理的研究。

二、离子交换剂的选择

离子交换色谱(IEC)已走进工业规模生产中，但是蛋白质的IEC分离机理相当复杂。为了提高生产能力，许多学者对蛋白质IEC进行了大量研究。1988年出版的“蛋白质离子交换色谱”[30]对蛋白质大分子的离子交换理论及应用实践作了详细论述，在复杂苛刻条件下要获优良分离效果，必须选用适合的离子交换剂。

1. 离子交换剂种类的选择

能与阳离子进行交换反应的称为阳离子交换剂，能与阴离子进行交换的为阴离子交换剂。蛋白质处于等电点时，其宏观上不带电，不能进行离子交换；当工作液的pH改变时，蛋白可以离子形态存在：

$$\underset{\text{阳离子形态}}{H_3^+N-R-COOH} \xrightleftharpoons{H^+} \underset{\text{等电点(R大分子链)}}{H_2N-R-COOH} \xrightleftharpoons{OH^-} \underset{\text{阴离子形态}}{H_2N-R-COO^-} + H_2O$$

$$pH \quad < \quad pI \quad < \quad pH'$$

如蛋白质在低于等电点的pH范围内稳定，带正电荷，则与阳离子交换剂进行交换反应；如蛋白质在高于等电点的pH范围内稳定，带负电荷，则可与阴离子交换剂反应；若蛋白质在高于或低于等电点的pH范围内都稳定，则既可用阳离子交换剂也可用阴离子交换剂，此时取决于工作液的pH值及杂质的带电情况。

2. 离子交换剂的强弱性

离子交换剂功能基性能可以用滴定曲线测定，这种曲线与无机酸碱的滴定曲线十分相似，从曲线形状可判断出功能基酸碱性的强弱，计算出其表观电离常数pK值。对酸性(阳)离子交换剂而言，pK值越小，酸性越强；碱性介质pK值越大碱性越强。从pK值还可判断出离子交换剂适用的pH值范围及洗脱剂的选择。如在低pH值时(pH<3.0)宜选用强酸性介质而不宜

用弱酸性介质；pH＞10 宜用强碱性介质而不宜用弱碱性介质。

对于某些电荷密度较高的物质，为避免其与介质的静电引力过大而造成不可逆吸附，以选用弱型离子交换剂为好。

3. 选择适宜工作条件，提高工作容量

离子交换剂是一种聚电解质，功能基的种类决定其电性能，功能基的多少决定其交换能力（以全交换容量及工作交换容量两个参数表示）。

全交换容量（total capacity）指每克干介质或每毫升湿介质具有的功能基的多少。该值可用酸碱滴定曲线测定，也可通过对小分子的“全交换”测定。每一种离子交换剂的全交换容量值为一定值，每次测定的数据相同，这是离子交换剂的基础参数。通用型离子交换剂的全交换容量较高，生化专用介质的全交换容量较低（葡聚糖系除外），这是由骨架决定的。

工作容量（working capacity）或称有效容量（available capacity）是指每克干介质或每毫升湿介质在一定操作条件下交换吸附蛋白质的实际容量。一定的操作条件是指所用的缓冲液的种类、工作液的 pH 值、杂质存在情况及流速等。因此有效容量是一个变值，凡标明有效容量时应附有实验条件。在柱中操作时它又与流速有关，所以又称为动力学容量（dynamic capacity）。

离子交换剂对各种分子的选择性不同，在初步选择介质之后，还应进一步确定适合的分离条件，才能充分发挥出离子交换剂的作用，才能获得较高的工作容量。总之离子交换剂的有效容量具有实际应用意义，它取决于蛋白质的性质、离子交换剂性质及所选择的实验条件。

第五节　生化用离子交换剂的特点及种类

一、生化用离子交换剂的特点

生化分离体系复杂，大分子受微环境影响较大，构象易变，因此分离活性大分子的生化专用介质还应具有特殊的性能。

1. 亲水性及生物相容性

亲水性介质在水中充分溶胀后成为“水溶胶”类物质，为活性大分子提供适宜的微环境，这类骨架衍生的离子交换剂与生物大分子有很好的生物相容性，常为生化专用介质，以天然大分子为主。依此特性选用含亲水基团的单体开发全合成的刚性、半刚性骨架的离子交换剂在生化领域中也获广泛用途，这是生化专用离子交换剂的新的发展趋势。

2. 孔结构

分离介质的孔有 3 种结构。第一种，通过交联使大分子链间形成孔，这叫凝胶孔。在溶胀时由于分子链的伸张孔变大，许多交联高聚物、葡聚糖等介质都具有这类孔，交联程度增加，孔径变小；第二种，在有溶剂存在条件下进行聚合，可制备象活性炭、泡沸石一样具有毛细孔结构的骨架，称为大孔树脂。这类孔在干态、湿态都存在，孔径最大可达 2.5 万～5 万 nm；第三种为琼脂糖介质的孔，由琼脂糖的胶束构成，仅与琼脂糖浓度有关，交联对孔结构影响不大。

生化用离子交换剂在分离中兼有分子筛与离子交换的双重作用，比通用的介质要求更高，要求孔径分布更加均匀。若生物大分子大于排阻极限，虽不能进入珠体内部但也可与珠体表面功能基进行反应，也可以有一些分离能力，只是工作容量低些。表 9－12 为苯乙烯树脂交联度与排阻极限的关系。

表 9-12 苯乙烯系树脂交联度与排阻极限的关系

交联度①，%	水份含量，%	排阻极限	树脂类型
2	80	2700～3000	凝胶型
4	70	1400～1500	
8	55	1000	
12	45	700	
16	40	600	
20	50～60	12000	大孔型
	70～80	75000	

① 交联度指单体中含交联剂的量。

3. 电荷密度

在无机小分子的交换过程中，交换剂的功能基密度越大，工作能力越强，因为被交换离子与交换基团之间按 1∶1 的摩尔比进行交换反应。但对大分子而言，一个大分子往往可以同时有几个带电点与多个功能基结合，并非是 1∶1 的比例。由于大分子的多点结合，可能使其发生构象变化，导致失活，这种多点结合也可使大分子与介质之间结合较牢，难以洗脱，造成不可逆吸附。为此，生化用离子交换剂的电荷密度适当才有利于对生物大分子的分离纯化，电荷密度过大反而不能获得满意效果。

4. 粒度

介质粒径越小、分布越均匀，理论塔板值越高、分离效果越好。粒径均一的 Monosphere 树脂不但在水处理中效果好，也被生物界采用，其粒径分布在 650±50μm 内的高达 99%[30]，美国 Bio Rex 的 MSZ 50 即为这种阳离子交换剂。MSZ1 强碱性阴树脂粒径在 550±50μm 范围内的亦占 99%。生化专用介质粒径分布更窄，先进的 Mono 系平均粒径为 10±0.5μm[31]。

生化专用离子交换剂的一大特点是粒径小，一般在 20～300μm 范围内，大于 150μm 者认为是"粗粒"，而通用型树脂粒径在 0.32～1.2mm 范围。生物大分子扩散速率小，运动阻力大，要提高交换速度只能减小粒径，因交换速度随粒径减小而增大，这是因为被交换的溶质在珠体内扩散路途变短的缘故。生化专用离子交换剂与常规树脂有相同的水力学性能，服从交换动力学基本规律。

5. 纯度

生化用介质可分以下几个等级。

(1) 工业级(Technical Grade) 适用于要求纯度不高的工艺过程或用量很大、用户用酸碱等处理纯化后使用。抗生素、细胞色素 C、肝素钠等生化药物大规模分离制备均采用这种价格低且易得的通用型介质。

(2) 分析级(Analytical Grade) 经过有机溶剂、络合剂及高纯酸碱处理后的产品，适用于分析试验。这类产品中有机杂质含量通常仅为百万分之几，重金属含量为 0.0005mg/kg，且粒径分布很窄。

(3) 生物技术级(Biotechnology Grade) 这类介质的物化性能与一般介质相同，但经过特殊纯化处理及灭菌，每克介质中存在的微生物小于 100 个且粒径小、分布均匀，适用于一般生化过程及从非离子生化产物中去离子。

(4) 分子生物级(Molecular Biology Grade) 这类介质的物化性能与一般离子交换剂无明显差异。为避免在分子生物学应用过程中对分离产物产生降解及干扰,要求介质中既无核酸内切酶、外切酶也无连接酶抑制剂,也叫DNA级。

为便于应用还出现了离子交换工具箱(Ion Exchange Resin Kits),箱中备有分析级交换剂、柱、某些实验专用材料及应用指南等,使用简便。

二、生化用离子交换剂的种类

目前国内外商品化的离子交换剂已有一百多个品种及牌号,80%以上用于水处理,年总产量近20万t[32]。国内约3%左右用于生物技术,大部分用于抗生素提取分离,生化专用介质还未工业化。以天然多糖为骨架的离子交换剂仅用于生化分离。还有一些全合成或半合成的介质也是为生化分离而研制的。这两类介质均称为生化专用离子交换剂,以示与用途广泛的通用型树脂相区别。

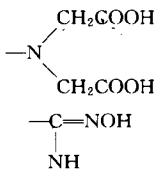
1. 通用型离子交换树脂

强酸、强碱、弱酸、弱碱及螯合型等通用型树脂在生化中主要用于从发酵液中提取分离抗生素、有机酸、氨基酸及天然资源中有效成份的提取分离。有的介质仍采用原牌号如Amberlite、Dowex等,也有的树脂经分筛、纯化后为某些仪器配套用而采用新牌号。以上两类牌号列入表9-13及表9-14中。

表9-13 通用型离子交换树脂牌号

牌 号	生 产 厂	备 注
Amberlite	Rohm & Hass (美)	各类树脂品种齐全
Duolite	R & H (美)	以酚醛系为主,有的用做固定化载体
Dowex	Dow 化学公司(美)	类型品种齐全
Zerolit	Zerolit 公司(英)	弱酸树脂生化应用较多
Lewatit	Bayer 公司 (德)	各类齐备
Amberlite	有机化学株式会社(日本)	只有强酸、强碱
Dowex	Dow 日本株式会社(日本)	
Diaion	三菱化成(日本)	品种齐全
KY,КБ,AB,AH	前苏联	
Wofatit	Bitterfeld (德)	
Ostion	捷克	
Varion	匈牙利	
Vionit	罗马尼亚	

表 9－14　某些通用型离子交换剂在生化领域中的牌号

牌　号	类　型	特　点
SERDOLIT －CS	强酸性	
－CW	弱酸性	(1)　高纯度，重金属含量 0.0005mg/kg
－AS	强碱性	(2)　粒度均匀，粒径在 0.04～1.2mm 内分多种级分
－AW	弱碱性	(3)　以 Cl^-、Na^+、H^+、Ca^{2+} 不同离子型出售
－MB	混杂用	
Chelite C N S		(1)　为大孔型结构 (2)　为分析级纯度
Bio－Rex	五大类均有	(1)　AG 为分析级，还有 HPLC 用、分子生物级、生物级等 (2)　各种类型均证明交联度
Biocarb	弱酸性	(1)　前苏联生化专用树脂 (2)　甲基丙烯酸系 (3)　大孔结构，分为 T、K、L、S 不同型号
Benson　BC－X	强酸性	
BCOOH	弱酸性	
BA－X	强碱性	(1)　粒径分布窄，分为多种级分
BWA	弱碱性	(2)　多为分析级及色谱级
Hitachi		(3)　有的树脂为仪器中配套装置的填料
Gel 3011－S	强酸性	(4)　有的树脂上带有“指示剂”，当变色时标志已失效
Gel 3011－C	弱酸性	
Gel 3011－N	强碱性	
Bio－Beads	吸附树脂	(1)　粒径在 200～400 目及 20～50 目范围内又分不同级分 (2)　Bio－Beads S 为苯乙烯系，Bio－Beado SM 为非苯乙烯系

2. 功能基种类

表 9－15 中列入各功能基种类。

表 9－15　离子交换介质功能基种类

序　号	符　号		功　能　基	分　类
1	阳离子交换剂	S－；SM－；SE－；SP－；	$-SO_3^-$；$-CH_2SO_3^-$；$-(CH_2)_2SO_3^-$；$-(CH_2)_2SO_3^-$；	强酸性
2		SB－	$-(CH_2)_4SO_3^-$	
3		P－	PO_3^{2-}	中等酸性
		C－；CM－	$-COO^-$；$-CH_2COO^-$	弱酸性

（续表）

序　号	符　号		功　能　基	分　类
4	阴离子交换剂	TMAM -；TEAE -	$-CH_2N^+(CH_3)_3$；$-(CH_2)_2N^+(C_2H_5)_3$；	强碱性
5		HEDMAM -	$-CH_2N^+(CH_3)_2C_2H_4OH$	
6		QAE -	$-CH_2N^+(C_2H_5)_2-CH_2CH(OH)CH_3$	
7		GE -	$-C_2H_4C(NH_2)=N^+H_2$	
8		MP -	$-C_5H_5NCH_3$	
9		DEAE -	$-(CH_2)_2N^+H(C_2H_5)_2$	
10		DEAHP -	$-CH_2CH(OH)CH_2NH(C_2H_5)_2$	中等碱性
11		AE -	$-(C_2H_4)N^+H_3$	
12		PEI -	$-(C_2H_4NH_2)_nC_2H_4N^+H_3$	
13		BD -	—苯基及 DEAE 基共存	中等碱且疏水
14		PAB -	$-CH_2-C_5H_4N^+H_3$	弱碱性
	两性交换剂	BA	$=N^+H(CH_2)_2COO^-$	两性
		CAI -	$-N^+H_2(CH_2)_nCOO^-$	
		A	$=NCH_2COO^-$	两性（偏向中等碱）
		SAHP	$-OCH_2CH(OH)CH_2N^+H_2C_6H_4SO_3^-$	两性（偏向在等酸性）

3. 生化专用离子交换剂

生化专用离子交换剂是凝胶过滤介质的衍生物，其骨架结构、粒径、排阻极限等与母体完全相同，凡前边已介绍过的在下节不再多述，仅从离子交换剂性能方面论述。

第六节　生化专用离子交换剂品种

一、纤维素类

离子交换纤维是最早用于生物大分子分离的介质，它具有松散的亲水网络、大孔、大的表面积等优点。纤维状物质不利于柱式操作，故而改进合成方法出现了珠状纤维。天然纤维素是由相邻的大分子链间氢键构成的微晶区与氢键较少的无定型区互相交错而组成。将无定型部分水解得到微晶纤维素。珠状离子交换纤维就是由高纯微晶纤维素经交联、功能基化而制备的。

DEAE - Sephacel 是在合成过程中破坏微晶结构经重新组合而得到珠状物，再用氯代环氧丙烷进行交联形成大孔结构，粒径为 40～160μm（湿态），排阻极限 1×10^6，适用于 pH2～12。在 pH7 时，120℃可消毒 30min。分离蛋白质时流速可达 10cm/h。

表 9 - 16 列出离子交换纤维素的主要商品牌号及性能。

二、葡聚糖系 Sephadex 离子交换剂[33]

Sephadex G25 及 G50 两种凝胶过滤介质为母体引入 4 种功能基，产生 8 种离子交换剂，具有较高的容量。牌号后字母 A 表示为阴离子交换剂，C 为阳离子交换剂。

Sephadex 离子交换剂的通性如下。

（1）Sephadex离子交换剂的溶胀度与所用缓冲液的pH值、离子强度及抗衡离子种类有

表 9-16 主要离子交换纤维素及性能

牌 号	生产厂	外观	溶胀体积 ml/g(干)	全交换容量 meq/g	有效容量 蛋白 mg/g	备 注
DEAE 纤维素 DE22	Whatman	纤维状	7.5～7.8①	1.0±0.1	450②	①在 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH7.5)中平衡
DE23		纤维状	9.1	1.0±0.1	450	②在 0.01mol/L、pH8.5 磷酸缓冲液中对牛血清白
DE32		微粒	6.3	1.0±0.1	660	蛋白吸附量
DE52		微粒	6.3	1.0±0.1	660	③在 pH8.3、0.05 mol/L Tris 中
DEAE 纤维素	Merck	微粒	/	/	/	
Cellex D	Bio Rad	纤维状	8	0.7±0.1	/	
DEAE-Sephacel	Pharmacia	珠状	/	0.95～1.35	160③	
CM 纤维素 CM22	Whatman	纤维状	7.7④	0.6±0.06	150⑤	④在 0.05mol/L 醋酸缓冲液中,pH5
CM23		纤维状	9.1	0.6±0.06	150	⑤在 0.08mol/L(pH3.5)磷酸缓冲液中对 γ-球蛋
CM32		微粒	6.8	1.0±0.1	400	白吸附量
CM52		微粒	6.8	1.0±0.1	400	
Cellex CM	Bio Rad	纤维状	7	0.7±0.1		
Cellex E	Bio Rad	纤维状	3.5	0.3±0.05	/	混胺基团 pK7.5
Cellex P	Bio Rad	纤维状	4.5	0.85±0.1	/	含磷酸基

关，该性能与其母体相同。

（2） 由于凝胶母体 G25 与 G50 孔度不同，所以相应的离子交换剂的应用范围也不同，分子量大于 3×10^4 者宜采用 A50 及 C50 以获较高的工作容量。

（3） 化学稳定性 Sephadex 离子交换剂不溶于水及各种溶剂。因糖苷键在强酸中可水解，因此应避免用 pH＜2 的溶液；由于 DEAE 基团在强碱溶液中不稳定，所以应避免用高 pH 值的溶液。再生时短时间使用 0.01mol/L NaOH 及 0.2mol/L HCl 对性能无影响。

（4） 物理稳定性 中性 pH 值时可于 120℃消毒 30min。消毒时放出微量糖，用无菌缓冲液洗即可去除。

表 9－17 为 Sephadex 离子交换剂性能。

表 9－17 Sephadex 离子交换剂性能

牌号	功能基性能①	全交换容量		有效容量②，mg/ml	
		mmol/g(干)	μmol/ml	甲状腺球蛋白 (M_w669000)	牛血红蛋白 (M_w 69000)
DEAE－Sephadex A－25	WB	3.5±0.5	500	1.0	/
A－50	WB	3.5±0.5	175	2.0	/
QAE－Sephadex A－25	SB	3.0±0.4	500	1.5	/
A－50	SB	3.0±0.4	100	1.2	/
CM－Sephadex C－25	WA	4.5±0.5	550	/	70.0
C－50	WA	4.5±0.5	170	/	140.0
SP－Sephadex C－25	SA	2.3±0.3	300	/	70.0
C－50	SA	2.3±0.3	90	/	110.0

① WB 为弱碱性； WA 为弱酸性； SB 为强碱性； SA 为强酸性。

② 流速 75cm/h。阴离子交换剂，0.05 mol/L Tris，pH 8.3；阳离子交换剂，0.1 mol/L 醋酸，pH 5.0。洗脱液为 2 mol/L NaCl。

三、琼脂糖系离子交换剂

由于其过滤凝胶有两大牌号，所以离子交换剂也有两大牌号。

1. Bio－Gel A 系离子交换剂

将琼脂糖珠体经交联后引入功能基而衍生出离子交换剂，有 DEAE 及 CM 两种，性能列于表 9－18 中。

表 9－18 Bio－Gel A 离子交换剂

牌号	类型	交换容量	
		全交换容量， μmol/ml	血红蛋白， mg/ml
DEAE Bio－Gel A	WB	20±5	45±10
CM Bio－Gel A	WA	20±5	45±10

2. Sepharose 系离子交换剂[34,35]

Sepharose 系的离子交换剂是由 Sepharose CL－6B、Sepharose Fast Flow 及 Sepharose High Performance 3 种骨架衍生而出的。与 CL－6B 相比，新产品 FF 系有更高的流速，而 High Performance 有更高的分辨率。

Sepharose 系离子交换剂通性如下。

（1） 在水、盐溶液及有机溶剂中结构稳定，改变溶剂时孔结构不发生明显变化，适用于有机溶剂中。

（2） 该系离子交换剂可在非离子型洗涤剂（如 Triton X－100、8 mol/L 尿、6 mol/L 盐酸胍）中使用，但不宜应用氧化剂。

（3） 虽该系离子交换剂能抵御微生物侵蚀，但由于许多缓冲液有利于微生物生长，所以应在制菌剂存在下保存。

表 9－19 列出该系离子交换剂性能。图 9－6 为 DEAE－Sepharose FF 与其它产品水力学性能比较。从图可见 Fast Flow 的确名符其实。

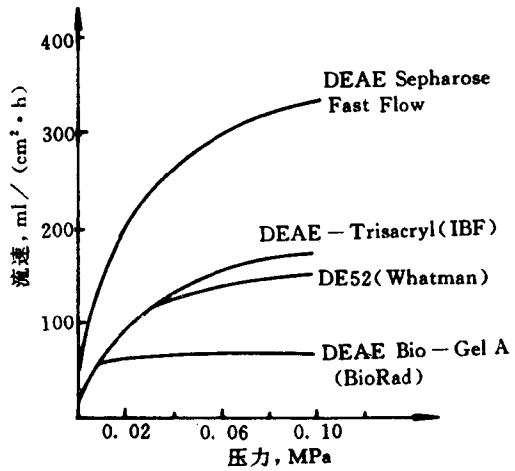


图 9－6 DEAE－Sepharose FF 与其它 DEAE 型离子交换剂流速比较

条件：柱为 Pharmacia XK 50/30；床高 15cm；床体积 29. 4ml；工作液 0. 1mol/L NaCl；在 0. 1MPa 时最大流速可达 400 cm/h

四、Toyopearl 离子交换剂[14,15,36,37]

该系为全合成离子交换剂，报道已衍生出多种功能基的介质，但目前商品化的仅为 DEAE 及 CM 离子交换剂。其具有稳定的结构，离子强度及 pH 值变化对床体积影响不大。

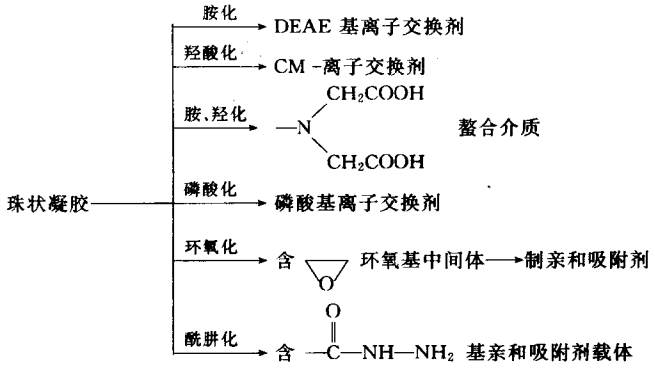


表 9－19　Sepharose 系离子交换剂性能

牌号	类型	粒径 μm	工作 pH 范围	交换容量 全交换量 μmol/ml	交换容量 有效容量，mg/ml 甲状腺球蛋白 (669000)	IgG (160000)	牛血红蛋白 (69000)	HSA (68000)	α-乳清蛋白 (14300)	核糖核酸酶 (13700)	水力学性能 床体积 ml	流速 cm/h	最大压力 MPa	理论塔板 /m	备注
Sepharose CL－6B											最大流速 100cm/h，但在色谱分离时最大线速度≯60cm/h				有效容量测定条件：流速 25cm/h 阴离子交换剂：0.05mol/L Tris pH 8.3 缓冲液 阳离子交换剂：0.1mol/L 醋酸 pH 5.0 缓冲液 洗脱液：含 2.0 mol/L NaCl 的缓冲液
DEAE	WB	45～165	2～9	130～170	2.0			170	150						
CM	WA	45～165	6～10	100～140		9.5	75			120					
Sepharose	FF										(1) 床高 15cm，0.1MPa 操作压下流速达 400cm/h (2) 其流速见图				
DEAE	WB	45～165	2～9	110～160	3.1			110	100						
CM	WA	45～165	6～10	90～130		15	30			50					
Q	SB	45～165	2～12	180～250	3			120	110						
S	SA	45～165	6～13	180～250		50	50			70					
Sepharose① High Performance Q	SB	24～44	2～12	140～200	牛血清蛋白 >90	(流速 150cm/h，pH7.5，0.15mol/L Tris 洗脱，缓冲液内含 0.8mol/L NaCl)					16/10 柱 20～22	150	3	>12000	(1) 通常，1mol/L NaOH 及 1mol/L 醋酸 仅在清洗中用 (2) 常规操作不用最大压力及最大流速
S	SA	平均 34	3～12	140～200							26/10 柱 20～22	150	3	>12000	

① 该系列有两种预装柱，其内径为 16mm 及 26mm，床高 10cm，分别为 Q Sapharose HP 16/10、26/10，S Sepharose HP 16/10、26/10。表内水力学性能数据均为这两种柱的数据；用于 Bio Pilot 系统中的柱为 35/100（介质 100ml）及 60/100（介质 300ml）。

Toyopear 离子交换剂性能示于表 9－20。

表 9－20　Toyopearl 离子交换剂性能

性能 \ 种类			DEAE－Toyopearl 650	CM－Toyopearl 650
介质类型			WB	WA
粒径 (S),μm			20～40	20～40
粒径 (M),μm			40～80	40～80
工作 pH 值范围			2～9	6～10
功能基 pH 值			11.5（可用于碱性蛋白质分离）	4.7
排阻极限 (PEG)			1 000 000	1 000 000
交换容量	全交换容量,mmol/ml		108	120
交换容量	有效容量 mg/ml	牛血清清蛋白	26	45
交换容量	有效容量 mg/ml	铁蛋白	15.0	/
交换容量	有效容量 mg/ml	甲状腺球蛋白	11.5	/
流速，ml/(h.cm²)			>300	>300

五、Mono Beads[38,39]系离子交换剂

Mono Beads 系离子交换剂是一类新型离子交换剂，对蛋白质、肽及低聚核苷酸等有很高的分离效率，其粒径分布极窄(10μm)。该系以亲水性聚醚为骨架，有 3 种类型功能基，性能参见表 9－21。

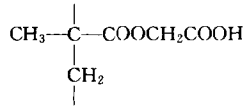
表 9－21　Mono Beads 系离子交换剂主要性能

型号	排阻极限	粒径(湿态) μm	pH 值稳定范围	工作 pH 值范围	全交换容量 μmol/ml	备注
Mono Q	1×10^7	10	2～12	3～11	270～370	强碱性阴离子交换剂，适于单克隆抗体分离
S	1×10^7	10	2～12	3～11	140～180	强酸性阳离子交换剂，适宜在低 pH 值时分离多肽
P	1×10^7	10	2～12	3～11	150～210	弱碱性阴离子交换剂，可用于聚焦色谱

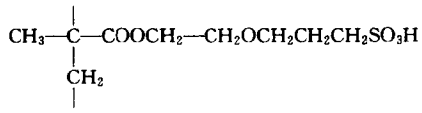
六、聚丙烯酸羟乙基酯系离子交换剂[40]

由捷克布拉格高分子化学研究院推出的 Spheron 牌号树脂是一类大孔型亲水性的硬基质离子交换剂，由甲基丙烯酸羟乙基酯与双甲基丙烯酸乙二醇酯共聚而成的大孔珠体(HEMA－EDMA)为母体的离子交换剂。大孔共聚物中含 24%～39%的 EDMA，以溶胀度、比表面、孔体积及排阻极限为主要参数。共聚体中含有大量羟基，可进行化学改性而衍生出多种离子交换剂。该系列虽为 70 年代产品，但未商品化，其衍生物如下所示。

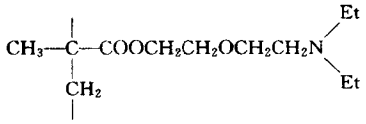
Spheron C



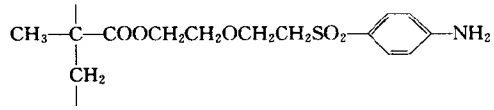
Spheron S



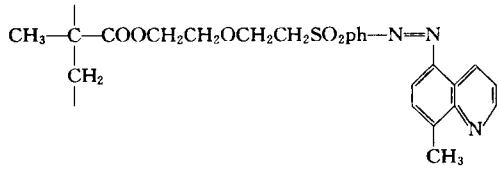
Spheron DEAE



Spheron ArA



Spheron Oxine



除上述各系离子交换剂外，还有已停产的 LKB 公司生产的 Trisacryl 离子交换剂。

参考文献

1 Richey, J., Am. Lab. 1982, 14, 104～129

2 Kramlova, M. et al. J. Chromatogr. 1982, 249, 403～404

3 Pristoupil, T. I. et al. J. Chromatogr. 1983, 280, 165～166

4 Lindblom, H. J. Chromatogr. 1983, 266, 265～271

5 Woody M. A. et al. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1988, 430, 279～289

6 Rihm, B. et al. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1988, 428, 408～414

7 Chambard. P., Reboul, A. J. Chromatogr. 1987, 369, 425

8 Pharmacia 公司"生物工程系列"中试层析系统 BioPiLot 介绍(1989)

9 Pharmacia LKB 导报 ,1990/91 P. 7

10 Ellegren, H., Laas, T. J. Chromatogr. 1989, 467, 217

11 Le Maire, M., Viel, A., Meller, T. Anal. Biochem. 1989, 177, 50～56

12 Pharmacia LKB 导报 ,1990/91 P. 9

13 Gellerfors, Par, et al. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1989, 7, 173～183

14 Isamu Matsumoto. J. Chromatogr. 1982, 239, 747

15 中原久惠. 日本化学会志. 1987,12,2308

16 JERKER PORATH, DER FLOEIN Nature. 1959, 183, 1657～1659

17 Janson J. G. Chromatogaphia. 1987, 361～369

18 Bio Rad Co. Catalogue O. 1991

19 Pauloin, A., P. Jolles, Nature. 1984, 311, 265～267

20 Mascher, T. K. Anal. Biochem. 1989, 177, 378

21 McClung, J. K. Anal. Biochem, 1989, 177, 378～382

22 Johansson, B-L., J. Chromatogr. 1986, 351, 136～139

23 Johansson, B-L., Ellstrom, C. J. Chromatogr. 1985, 330, 360

24 Andersson, T., Carlsson, M., J. Chromatogr. 1985, 326, 33～34

25 Hagel, L., Lundstrom, H., Andersson, T. J. Chromatogr. 1989, 476, 329～344
26 Raymond, G. J. Anal. Biochem. 1988, 173, 125～133
27 Gellerfors, Par J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis. 1989, 7, 173～181
28 LKB－Produkter AB Ultrogel and Trisacryl Apractical Gauid to Gel Filtration (1984)
29 Shuichi Yamamoto, Kazuhiro Nakanishi, Ryuichi Matsuno " Ion－Exchange Chromatography of Proteins " Marcel Dekker. Inc. New York (1988)
30 Dow Chemical Company 产品说明书 " Dowex Monosphere Resins " (1988)
31 Ugelstad, J. Nature. 1983, 303, 95～96
32 王佳兴. 离子交换与吸附. 1987, 3(1), 53
33 Orr, G. A. Anal. Biochem. 1984, 142, 232
34 Rauch, P. et al. J. Chromatogr. 1988, 438, 451
35 Hallin, P., Khan, S. A. J. Liquid Chromatogr. 1988, 11, 1261
36 Yoshio Kato J. Chromatogr. 1983, 268, 425
37 Ojima Takao J. Biochemi (Toky) 1988, 104(1), 9
38 Westman, E. Anal. Biochem. 1987, 166, 158
39 Söderberg, L. Protides Biol. Fluid. 1983, 30, 629
40 O. Mikes. Reactive Polymers. 1988, 8 (2), 105

第十章　有机高分子基质的高效液相色谱分离柱填料

苏天升

（中国科学院化学研究所，北京，100080）

第一节　概　述

随着生物化学和生物技术的发展，对于各类生化物质特别是活性生物大分子的分析与分离纯化，已成为目前至关重要的研究内容。在现有的分离技术中，液相色谱尤其是70年代以来迅速发展起来的高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography，HPLC)，已被普遍认为是当前分离分析生化样品最有效的技术手段。

同其它分离技术相比较，HPLC方法的主要特点是：它的分离效率高，选择性好，适于各种多元组分复杂混合物的分离；它的应用范围从无机物到有机物，从天然物质到合成产物，从小分子到大分子，从一般化合物到生物活性物质等。可以说几乎包括了所有类型物质；它可以根据分离对象，按不同分离机理，广泛选择色谱柱、淋洗体系和操作参数；它既是精细的分离纯化方法，也是快速、灵敏、准确、简便的分析检测手段；它可以处理从痕量、微量到常量以至较大规模制备的样品量，可以实现在线检测和自动化操作。

HPLC方法是基于样品分子在固定相(即柱填料)和流动相(即淋洗液)之间的特殊相互作用而实现分离的。该技术的实施除了具备专用的高压输液系统和高灵敏检测系统等设备之外，最关键的还需要有高效分离柱。分离柱是色谱的核心，高效分离柱填料的研究是现代液相色谱方法赖以建立和发展的基础。

目前HPLC已发展成为包括有许多分支的综合性分离技术。按它们的分离机理可分为：基于吸附分配作用的反相、正相和疏水性相互作用色谱；基于电荷作用的强阴、强阳、弱阴、弱阳离子交换色谱；基于空间排除作用的凝胶过滤和凝胶渗透色谱；基于生物特异性作用的亲和色谱等。各个分支技术的分离机理、用途和特点不同，对于所使用填料在结构和性能方面均有各自特定的要求。从填料的基质材料来看，一般可分为无机(如硅胶、可控孔玻璃、羟基磷灰石、石墨化炭黑等)和有机(如天然的与合成的高分子)两大类型。

近十年来，随着合成技术的进步，以有机高分子为基质的HPLC填料获得了迅速发展，新产品竞相出现，并广泛应用于各个分支技术中。有关这方面的进展状况，已在一些周期性的综述中给出了较为系统的参数目录[1~8]。对于这类精细分离材料的研究，也已成为功能高分子学科的重要组成部分。

第二节　高分子类型 HPLC 填料的特征

同硅胶基质的 HPLC 填料相比较，高分子类型填料的普遍特征主要表现在：

(1) 它们的基质微球可以广泛选择各种单体和交联剂来聚合，并且这些聚合物容易进行化学改性处理，所合成的产品普遍有良好的色谱选择性；

(2) 它们对于样品的负载能力强，有较高的色谱容量；

(3) 它们具有良好的化学稳定性，可以在广泛的 pH 值范围内使用；

(4) 它们不易产生不可逆的吸附作用，特别对于生化物质的分离能够较好地保存其生物活性。

诸多优点，决定了高分子类型填料广阔的发展前景，尤其对于分离纯化活性生化物质所表现的良好性能，已越来越受到研究者和应用者的重视。有人曾预计，在今后一些年里，有机高分子基质的填料将可能成为主要的发展方向。需要指出的是高分子微球的颗粒刚性还不如硅胶，孔结构也比较复杂，在淋洗体系的变化过程中可能会产生膨胀或收缩。这些影响色谱柱效率的主要因素，仍有待于研究解决。

第三节　高分子类型 HPLC 填料的制备

一、HPLC 技术对于填料的一般要求

简单说来，在色谱分离过程中，填料的化学结构是影响色谱热力学行为(如保留值、选择性)的主要因素，而填料的物理结构则是影响色谱动力学行为(如柱效率、穿透性)的主要因素，对于 HPLC 填料，应在物理和化学性质方面满足如下要求：(1)具备合适的颗粒大小(分析级一般为 5～10μm，制备级可以大一些)和较窄的粒度分布范围，最好能实现粒度单分散。(2)具备一定的机械强度，即具有可以满足高压使用的颗粒刚性。(3)若为多孔结构，则需达到一定的孔径和孔径分布要求，并尽可能避免复杂的孔结构形态。(4)应具备必要的化学稳定性、热稳定性，不易产生不可逆吸附性。

二、高分子基质微球的合成

基质微球是 HPLC 填料的支撑骨架，它将直接决定填料的颗粒大小、刚性程度和孔结构形态；也会直接影响到能否有效地引入具有分离选择性的官能基团。因此，欲获得高柱效、高选择性、高分离度的柱填料，对于基质微球的合成以及结构性能的研究是至关重要的。目前所使用的基质材料最主要的是交联聚苯乙烯，其它交联共聚物如交联聚醋酸乙烯酯、交联聚乙烯醇、交联聚甲基丙烯酸及其酯类、关联聚烯亚胺与聚酰胺类、交联聚乙烯吡啶、交联聚乙二醇以及高交联琼脂糖等也得到广泛的应用。

基质微球的合成如果采用经典的悬浮聚合方法，所得颗粒通常大于 100μm，而且粒度分布范围比较宽；如果采用经典的乳液聚合方法，则只能得到小于 1μm 的微粒。于是人们试图寻找一种介乎于悬浮和乳液聚合之间的新方法。实践证明，选择适当的分散稳定体系，并借助于特为设计的分散聚合装置，是可以达到目的的。所选择的分散稳定剂通常都是几种组分(有机和无机)的复合体，它们既可提高聚合体系的悬浮分散作用，又能抑制反应过程中的乳化作用，兼备了两种聚合方法的特点。所合成的产品经分级和处理即能满足要求。目前许多商品化

HPLC 填料的基质微球就是用这种方法获得的。

在过去的一些年里，对于颗粒单分散的高聚物基质微球的研究已取得了显著进展。Ugelstad[9,10]使用二步溶胀法制出了粒度单分散的交联聚苯乙烯微球。该方法首先是合成粒度小于 1μm 的高聚物胶乳作为"种子"，让其"种子"在水相中吸附不溶于水的低分子有机物进行溶胀，然后吸附单体进一步溶胀并聚合。用此原理所合成的粒度约 10μm 的单分散微球，经化学修饰后已成为性能优异的填料，并在高效离子交换色谱中得到应用。Vanderhoff[11]研究了微重力环境中连续溶胀聚合方法，制备出了较大颗粒的单分散高分子微球。Matijevic[12]报导了使用单体气溶胶的阳离子聚合制备 10～20μm 单分散高聚物颗粒的方法。Colvin 等[13]描述了一种喷射-冷冻成形和辐射聚合的技术线路，合成出的较大颗粒的单分散微球。柴志宽等[14]介绍了一种静态的相分离聚合方法，其原理是在液相介质中单体聚合成低聚体，当其分子量达到某一限度时不再能溶于介质而产生相分离，被分离出来的低聚体由于表面张力作用，成为液珠悬浮在液相介质中，液珠继续以比较高的速度聚合、交联硬化，并以较低速率沉降，这样可以避免硬化前的碰撞、粘结，从而得到颗粒较为均匀的微球。该方法虽然达不到颗粒单分散，但是操作简便，易于控制，合成物的粒度适宜并无需筛分。

三、基质微球的化学改性

所合成的基质微球，按其物理-化学结构特征，有一些产品就可以直接作为色谱填料来使用，但是在大多数情况下还需经过化学改性处理。化学改性是根据不同色谱方法的需要，在基质微球上引入适量的带有特定官能基团的物质，以达到所期望的色谱选择性。在不同 HPLC 分支技术中，一些常见填料所携带的选择性基团或化合物分别为：

离子交换色谱填料含有$-N^+(CH_3)_3$、$-CH_2CH_2N(C_2H_5)$、$-SO_3^-$、—COOH 等离子交换基团。

反相色谱填料含有 C_{18}、C_8 烷基以及苯基等强疏水性基团。

正相色谱填料含有—OH、$-NH_2$、—CN、—COOH、醚链等极性基团或链段。

疏水性相互作用色谱填料含有 C_1～C_4 烷基、苯基、聚乙二醇等弱疏水性基团或链段。

空间排除色谱填料，其中用作水相体系的凝胶过滤填料含有—OH 等亲水性基团。

亲和色谱填料携带有抗体、激素、抗菌素、酶等具备生物特异性的配基。

应当指出，在化学改性过程中，一般应当先将基质微球进行亲水性处理。因为除了凝胶渗透色谱使用油相体系以外，其它色谱方法的淋洗介质都有水参与，所以，为了增强固定相与淋洗剂的匹配能力，对于基质微球（尤其是非极性基球）进行亲水性处理是很有必要的。处理方法是在基质微球表面首先引入亲水性基团或链段，然后再引入适当的选择性基团或化合物。这样一来将有一部分亲水性基团或链段会成为起连接作用的间隔臂。实践证明，合适的间隔臂对于改善色谱传质、提高分离选择性是甚为有利的。

通常用作 HPLC 填料的高聚物树脂大都是具有多孔结构的微球，其孔径为几个、几十以至上百纳米。为了增强颗粒刚性和 改善孔结构形态，以提高填料的色谱传质性能，近几年来对于树脂的合成出现了两种明显的发展趋势。第一，向小颗粒非多孔结构发展，有关这方面的研究已有许多报导。例如，以 2.5μm 亲水性高聚物为基质所制得的非多孔型反相、离子交换和疏水性相互作用色谱填料，其柱效、选择性、分离度以及对活性样品的回收率等指标都是令人满意的，用于快速分离蛋白质、核酸等生物大分子是很成功的[15]。第二，向穿通性超大孔结构发展，最近报导的所谓灌注色谱（Perfusion Chromatography）填料就具有这种结构特征[16]。它的

基质是高交联的聚苯乙烯微球，粒度为 10μm 或 20μm，在 600～800nm 的孔内连接着 80～150nm 的穿通性孔。用这种结构的树脂所发展成的反相、离子交换、疏水性相互作用以及亲和色谱填料，对于生物大分子样品的色谱传质十分有利，流速适应范围相当宽，柱效高而柱压降很小，并有较高的色谱容量。

第四节　填料性能的评价

一、填料物化性质的表征

填料颗粒大小 d_p(μm)及其分布，可使用显微镜观测或使用粒度分布仪测定。

填料的比表面积 $S(m^2/g)$，一般用 BET 方法测定。

填料的骨架密度 ρ_g(g/ml)、溶剂吸收量 Sr(ml/g)、溶胀因子 f 等参数，可用文献[17]所述方法测定。

填料的比孔体积 V_p(ml/g)，可以根据 Sr、f 及 ρ_g 值，按下式求得：

$$Sr=fV_p+(f-1)/\rho_g \qquad (10—1)$$

填料的孔度 ψ 为：

$$\psi=\frac{V_p}{V_p+1/\rho_g} \qquad (10—2)$$

填料的孔径大小及其分布的测定，通常使用毛细管凝聚法(<30nm 的孔)、压汞法(>30nm 的孔)以及电镜法等。对于孔的结构形态，可以使用扫描电镜直接进行观察，也可以通过色谱行为或其它性质进行间接表征。

填料的化学结构(如组成、骨架结构、官能基团等)与化学性质(如对溶剂的化学稳定性、pH 值适应性、离子交换剂的交换容量等)，可以用常规的化学分析方法及相应的仪器分析手段予以表征。

二、填料色谱性能的表征

虽然不同分离机理的色谱填料各有其特定的性能指标，但是如下所述的一系列最基本的色谱参数，对于任何填料的评价都是有意义的。

1. 保留值

保留时间(t_R)指样品在填充柱中的滞留时间，若以体积来表示则称保留体积：

$$V_R=t_R\cdot F_c \qquad (10—3)$$

式中 F_c 为流动相流速。如果扣除不保留物质的流出时间即死时间(t_0)，则可得到调整保留值：

$$t_R'=t_R-t_0 \quad (\text{或 } V_R'=V_R-t_0F_c) \qquad (10—4)$$

容量因子(k')是色谱中广泛采用的保留值参数，

$$k'=\frac{t_R}{t_0}-1=\frac{t_R'}{t_0} \qquad (10—5)$$

在 HPLC 中 k' 只与固定相、流动相性质及柱温有关。

2. 选择性

选择性(α')表示相邻二物质保留时间的比值，

$$\alpha'=\frac{t_{R(2)}}{t_{R(1)}}=\frac{1+k'_{(2)}}{1+k'_{(1)}} \qquad (10—6)$$

α'值是与固定相种类、流动相组成以及温度有关的参数。

3. 柱效率

目前色谱法广泛使用理论塔板数(N)来表示柱效率，

$$N=5.54\left(\frac{t_R}{2\Delta t_{1/2}}\right)^2 \tag{10—7}$$

式中$2\Delta t_{1/2}$表示色谱峰的半高宽度。或者利用理论塔板高度(H)来表示柱效率，

$$H=\frac{L}{N} \tag{10—8}$$

式中L为色谱柱长度。从理论上解释色谱谱带加宽效应是较为复杂的，在HPLC中通常使用如下方程综合性地描述各种因素对H的影响，

$$H=Au^{0.33}+\frac{B}{u}+Cu \tag{10—9}$$

式中u为流动相线速度，A、B、C分别表示涡流扩散、纵向扩散和固定相传质效应对H的贡献。在一些评价色谱柱的文献中，对于H、u、L等值也经常用Knox[18]所推荐的无量纲的折合参数形式来表达。

4. 填充柱的总孔隙度和穿透性

填充柱的总孔隙度(ε_T)，可由下式计算：

$$\varepsilon_T=\frac{F_c t_0}{V_c} \tag{10—10}$$

式中V_c为空柱体积。柱子的穿透性(K_f)定义为：

$$K_f=K_0\varepsilon_T=\frac{u\eta L\varepsilon_T}{\Delta P} \tag{10—11}$$

式中K_0为穿透性常数；η为流动相粘度；ΔP为柱压降。

5. 分离度

分离度(R)被定义为相邻两色谱峰的保留值之差与各自峰底宽度($t_{w(1)}$和$t_{w(2)}$)一半之和的比值，

$$R=\frac{t_{R(2)}-t_{R(1)}}{\frac{1}{2}(t_{w(2)}-t_{w(1)})}\approx\frac{t_{R(2)}-t_{R(1)}}{t_{w(1)}} \tag{10—12}$$

按此定义可以推导出，

$$R=\frac{1}{4}(\alpha-1)\sqrt{N}\left(\frac{k'_{(1)}}{1-k_{(2)}}\right) \tag{10—13}$$

式中$\alpha=t'_{R(2)}/t'_{R(1)}=k'_{(2)}/k'_{(1)}$表示相对保留值。由式(10—13)可以看出，$R$值是分离效能的综合指标。

第五节　高分子类型的吸附分配HPLC填料

一、高效反相色谱填料

反相色谱(Reversed Phase Chromatography，RPC)可以说是HPLC技术中最大的一个分支，它的分离对象几乎覆盖了所有类型的化合物。目前RPC分离柱仍然是以硅胶基质的键合

相填料为主体。特别是键合 C_{18}、C_8 烷基以及苯基填料的出现，使该技术得到长足发展，被极其广泛地用于各个领域。这类填料的最大特点是颗粒刚性好，有利于传质，可以得到很高的柱效，并有良好的选择性。但是硅胶基质填料的 pH 值适应性一般都限制在 2～8 之间。此外，当基质表面的硅羟基不能被完全覆盖时，则可能使欲分离的蛋白质等生化样品失去活性。

高分子基质的 RPC 填料，目前较为广泛使用的是微球形交联聚苯乙烯树脂。这类树脂的表面具有烷基键合相那种非极性的特征，因此无需化学改性就可以直接用作 RPC 填料。近年来也出了一些其它类型(包括烷基衍生)的高分子基质 RPC 填料，例如醋酸乙烯酯共聚物[14]、带有 C_{18}烷基侧链的聚丙烯酰胺[19]、聚甲基丙烯酸的烷基酯化物和聚乙烯醇的酯化物[20]、C_{18}烷基键合的聚乙烯醇[21]以及 C_{18}烷基衍生的交联聚苯乙烯等。表 10－1 给出了一部分商品化了的高分子类型 RPC 填料。这类填料都可以在广泛的 pH 值(2～12，甚至 1～13)范围内使用。从化学结构来看，树脂表面均有较强疏水性作用，其色谱性能基本上类似于硅胶基质的烷基键合相填料。图 10－1 为在相同条件下分别使用交联聚苯乙烯和硅胶键合 ODS 填充柱对于牛血清蛋白(BSA)分解产物的分离结果。从对比中可以看出，两种类型填料的 RPC 性能是基本相近的。此外，从填充柱的稳定性和使用寿命来讲，交联聚苯乙烯填料要更好一些。图 10－2 表明蛋白质混合样品在商品 PLRP－S 填充柱上的分离结果。

表 10－1　部分常见的高分子类型高效反相色谱填料

名　称	基质材料	粒度，μm	孔径，nm	应　用
TSK gel Phenyl－5PW RP	亲水高聚物	10	100	分离蛋白质、肽、核酸等
TSK gel Octadecyl－4PW	亲水高聚物	10	50	分离蛋白质、肽等
TSK gel Styrene－250	PS－DVB	5，10		分离药物、食品添加剂等
TSK gel Octadecyl－NPR	聚丙烯酸酯类	2.5	非多孔	快速分离蛋白质等
Hamilton PRP－1	PS－DVB	10	7.5	分离核苷、磺胺药等
Hamilton PRP－3	PS－DVB	10	30	分离蛋白质、肽等
ARPP	PS－DVB	5，10	8	类似于 C_{18}键合相填料
PLRP－S	PS－DVB	8，10	30、100	分离蛋白质、肽等
ACT－1	PS－DVB－C_{18}	10		与 C_{18}键合相填料性能同
Shodex RS pak DS－613	PS－DVB			类似于 C_{18}键合相填料
Shodex RS pak DS－613	聚丙烯酸酯类			类似于 C_{18}键合相填料
Polypore phenyl RP	PS－DVB	10	30	分离生物大分子化合物
Polypore RP	PS－DVB	10	8	类似于 C_{18}键合相填料
Bio Gel PRP 70－5	含 Benzyl 高聚物	5	7	分离高分子和有机物
Bio Gel PRP+	含 Phenyl 高聚物	70	100	分离高分子和有机物

目前常见的高分子类型 RPC 填料主要是多孔型树脂，但也出现了非多孔结构的填料[22,23]。这类填料用于快速分离蛋白质等具有良好的色谱行为(见图 10－3)。非多孔型树脂作为分离柱填料的新发展，在其它 HPLC 技术也均已得到应用。

反相色谱的保留机理目前尚不完全清楚。有人认为是分配作用，即淋洗液中的有机溶剂与填料表面的有机基团或链段首先形成“液相层”，而溶质分子就在淋洗液与“液相层”中进行分配。也有人认为是吸附作用，即溶质分子中的非极性部分与填料表面的非极性基团或链段之间

强的疏水性相互作用，而这种作用表现出类似于吸附的特征。

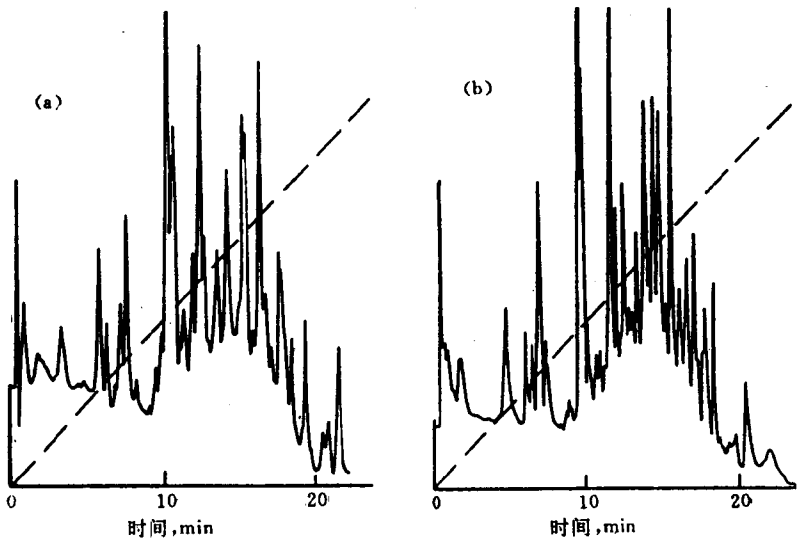


图 10－1　BSA 酶分解产物在两种填充柱上的 RPC 性能比较

(a)　交联聚苯乙烯填料分离柱；

(b)　硅胶基质 ODS 键合相填料分离柱

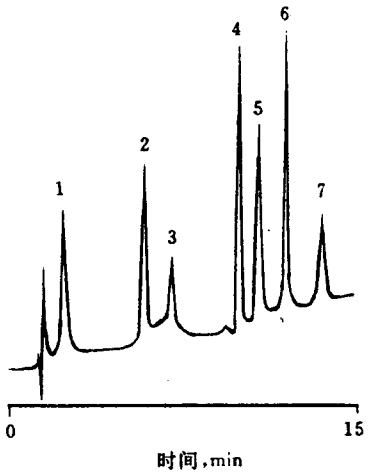


图 10－2　标准蛋白质混合样品的 RPC 分离

分离柱：PLRP－S 30nm(250mm×4.6mm)；

淋洗液 A：水含 0.1%TFA；淋洗液 B：95%乙腈含 0.1% TFA；

梯度：线性 20%～60%B(22min)；流速：1.5ml/min；

检测：UV220nm；

样品：1—核糖核酸酶；2—胰岛素；3—细胞色素 C；4—溶菌酶；5—牛血清蛋白；6—肌红蛋白；7—卵清蛋白

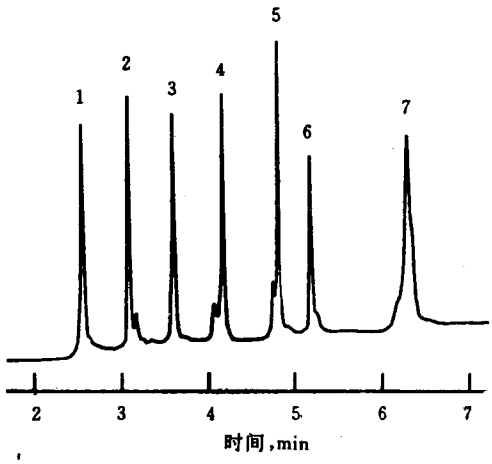


图 10－3　蛋白质混合样品在非多孔型填料上的 RPC 分离

分离柱：TSK gel Octadecyl－NPR(35mm×4.6mm)；

淋洗液 A：水含 0.05%TFA；淋洗液 B：乙腈含 0.05% TFA；

梯度：线性 15%～80%B(10min)；流速：1.5ml/min；

检测：UV220nm；

样品：1—核糖核酸酶；2—胰岛素；3—细胞色素 C；4—溶菌酶；5—乳白蛋白；6—肌红蛋白；7—卵清蛋白

二、高效正相色谱填料

正相色谱(Normal Phase Chromatography，NPC)的保留机理一般认为是基于溶质分子在流动相与固定相之间的分配作用。所使用的柱填料都具有一定极性。典型的硅胶基质 NPC 填料常含有诸如—OH、—NH_2、—CN 等极性基团。高分子类型 NPC 填料一般是在基质树脂上引入极性基团链段，或者由极性单体直接共聚而制得。例如商品填料 TSK gel Acetate－60 是含醋酸酯类基团的高聚物，TSK gel Ether－250 是带有醚链的高聚物，Hitachi Gel 3020 是甲基丙烯酸酯类共聚物，ACT－2 是乙烯吡啶的共聚物，RSpakDC－613 是聚苯乙烯基质的性能类似于氨基键合相的亲水性树脂等。有人把一些专用色谱填料，诸如用于糖、酸、醇类以及光学异构体等分离的树脂也划归为 NPC 填料范围。

极性填料尤其是极性高分子树脂类型填料的应用范围相当广泛。除了 NPC 以外，在 HPLC 的其它分支技术中，如离子交换、水相空间排除、亲和以及各种专用色谱等，使用的都是极性填料。有些填料还可以在两种色谱方法上兼备使用，例如，甲基丙烯乙二醇酯交联共聚树脂[24,25]和乙烯吡咯烷酮共聚树脂[26]，既可作为 NPC 填料，也可用于空间排除色谱。所以对极性填料的分类方法，可按填料的组成、结构、性能、分离机理、色谱应用等情况并根据自己的需要来进行。

三、高效疏水性相互作用色谱填料

疏水性相互作用色谱(Hydrophobic Interaction Chromatography，HIC)是为了适应活性生物大分子特别是蛋白质的分离而开展起来的一种 HPLC 方法。HIC 柱填料的表面具有弱疏水性特征。如果说前面所述的 RPC 方法是基于强疏水性作用的话，那么 HIC 方法则是依赖于溶质与填料表面之间弱的疏水性相互作用。在高离子强度的盐水溶液淋洗条件下，蛋白质分子中的疏水性部分与填料表面产生疏水性相互作用而被吸附，当淋洗液的离子强度逐渐降低时，蛋白样品则按其疏水性特征被依次洗脱，疏水性越强，洗脱的时间越长，用此原理来实现分离。同反相色谱相比较，HIC 方法的最大特点是既可以避免使用含有大量有机溶剂的淋洗体系，也能有效地保持被分离物质的生物活性，因此在活性生化物质的分离纯化方面被广泛采用。

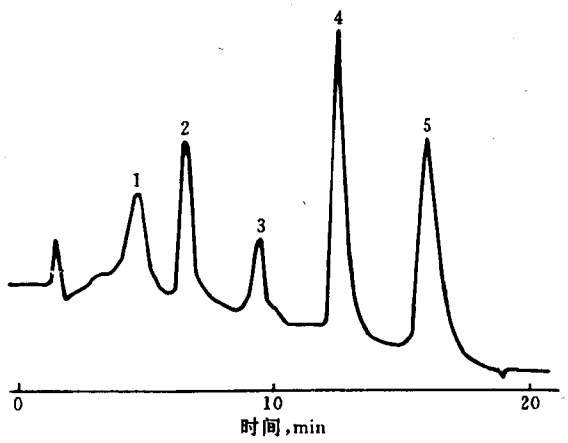


图 10－4　蛋白质混合样品的 HIC 分离

分离柱：Macrosphere/R HIC (250mm×4.6mm)；

淋洗液 A：20mmol/L NaH_2PO_4＋2mol/L$(NH_4)_2SO_4$ (pH7.0)；

淋洗液 B：20mmol/L NaH_2PO_4(pH7.0)；

梯度：线性 A→B(20min)；　流速：1.0ml/min；

检测：UV280nm；

样品：1—细胞色素 C；2—肌红蛋白；3—核糖核酸酶 A；4—溶菌酶；5—铁蛋白

常见的商品化键合相 HIC 填料，一般都是在硅胶微球表面键合一层亲水性的有机层，然后再连接上各种具有一定疏水性的基团，如羟丙基、甲基、丙基、丁基、苯基、戊基、苯甲基等。蛋白质在这类填料上的保留时间基本上按所键合基团疏水性递增而加长。

高分子类型 HIC 填料，通常都是在亲水性高聚物基质微球表面引入疏水性基团或适当长度的醚链，例如，琼脂糖凝胶被引入戊基、辛基和聚乙二醇所衍生的产物[27,28]，亲水性高聚物凝胶被引入苯基、低聚乙二醇的产物[29,30]，尿醛树脂被疏水基所修饰[31]等。所有这些经化学改性处理后具有弱疏水性的树脂作为 HIC 填料，对于蛋白质的分离都是有意义的。广泛应用的商品化填料主要有 TSK gel Phenyl－5PW、Ether－5PW（粒度为 10μm、孔径为 100nm 的亲水性高聚物微球分别键合苯基和醚链）、HRLC MP7 HIC（粒度为 7μm、孔径为 90nm 的引入甲基的高聚物微球）、Macrosphere/R HIC（粒度为 10μm、孔径为 35nm 的甲基丙烯酸羟乙酯与二甲基丙烯酸乙二醇酯交联共聚物微球）等。图 10－4 给出了一个分离蛋白质的例子。

HIC 方法对于蛋白质等活性生化样品的分离，是在水相体系中进行的，为了使固定相能与淋洗液相匹配，填料的基质微球应具备一定的亲水性。因此从化学结构来看，所述填料大部分都是在原有亲水性凝胶的基础上发展起来的。

非多孔结构的树脂作为 HIC 填料也已出现了商品，如 TSK gel Butyl－NPR。Hjerten[32] 曾介绍过使用大孔琼脂糖凝胶经收缩、交联和非极性配基衍生而制得的一种非多孔树脂，以其作为 HIC 填料，对于快速分离蛋白质混合样品也是甚有特色的（见图 10－5）。

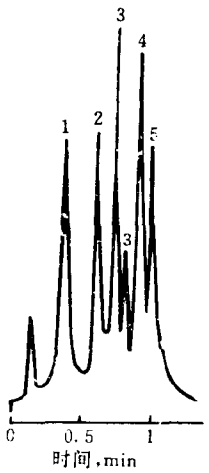


图 10－5　非多孔型 HIC 填料对蛋白质的分离

分离柱：非多孔琼脂糖基质 HIC 填料（55mm×4.6mm）；

淋洗液 A：0.01mol/L NaH_2PO_4＋0.25mol/L $(NH_4)_2SO_4$（pH6.8）；

淋洗液 B：0.01mol/L NaH_2PO_4（pH6.8）；

梯度：线性 A→B 体积 3.2ml；　流速：4ml/min；

检测：UV280nm；

样品：1—核糖核酸酶；2—卵清蛋白；3—胰凝乳蛋白酶原；4—过氧化氢酶；5—铁蛋白

第六节　高分子类型离子交换 HPLC 填料

一、高效离子交换色谱填料

离子交换色谱（Ion Exchange Chromatography，IEC）是在诸多 HPLC 分支技术中最先得到发展和应用的。该方法对于分离各类生化物质，诸如蛋白质、肽类、氨基酸、核酸、核苷、碱基、碳水化合物等，尤为适宜，因而在生物化学、医学、农学等一系列与生命科学相关的领域中，它已成为非常有效的应用极其广泛的分析检测和分离纯化手段。

IEC 的分离机理是建立在样品分子与固定相表面基团之间电荷相互作用的基础上的。这种相互作用可能表现为离子与离子、偶极与离子或者其它动态平衡作用力的形式。按所使用的离子交换剂，IEC 方法可分强阴、强阳、弱阴、弱阳离子交换 4 种方式。

在 IEC 方法中，相比之下高分子类型填料表现了更大的优越性。这类填料几乎可在全程 pH 值范围内使用，对于广泛选择各种缓冲液淋洗体系十分有利；填料的使用寿命长，即使柱子受到污染，也比较容易通过再处理使其性能得以恢复；填料普遍有较高的色谱容量，甚至可比硅胶键合相离子交换剂高一个数量级；填料的基质骨架结构，一般很少有非特性吸附，对于保持样品生物活性是很有利的。所以，在 IEC 的应用中，高分子类型填料占据很重要的地位，尤其对活性生化样品的分离纯化有广阔的发展前景。

常见的高分子类型 IEC 填料多以交联共聚的苯乙烯-二乙烯苯为基质[33~36]，同时也出现了许多其它交联高聚物基质的 IEC 填料，例如，以亲水性高聚物凝胶为基质的[37,38]，以聚甲基丙烯酸酯类为基质的[39,40]，以 *N* -乙烯吡啶共聚物为基质的[41]。这些填料一般都是高交联大孔结构的微球，具有良好的刚性和小而均匀的粒度（一般 10μm）。填料按其所带基团，通常分为强碱性阴离子型（含季胺基）、弱碱性阴离子型（含伯、仲胺基）、强酸性阳离子型（含磺酸基）、弱酸性阳离子型（含羧酸基）。表 10－2 列出了一部分常见高聚物基质 IEC 填料（包括非多孔填料）的结构与性能特征。这些填料除 Aminex HPX 系列之外，均可在 pH2～12 的范围内使用，甚至更宽一些。

在以交联聚苯乙烯为基质的 IEC 填料中，Mono Beads 系列[34]可认为代表了当前的先进水平。这种填料的基质微球是用前面所述的单分散聚合方法制得的。基质微球经化学改性处理变成亲水性高聚物，然后再连接上季胺基团或磺酸基团，制得粒度单分散的具有大孔结构和中等交换容量的阴阳离子交换剂（Mono Q 和 Mono S）。该系列填料对于活性生物大分子的分离纯化，在柱效、分离度、回收率、负载量以及穿透性方面所表现出的优异性能，使其得到了广泛应用[42~46]。

以亲水性高聚物凝胶为基质的 IEC 填料，如 TSK gel DEAE－5PW、SP－5PW、CM－5PW 等，是目前应用最为广泛的产品[47~49]。它们都是在原有亲水性凝胶过滤色谱填料（TSK gel PW）的基础上发展起来的。这种大孔径、小粒度、中等交换容量的树脂作为高效柱填料，对于蛋白质、肽类、核酸等活性生化样品均表现了良好的分离作用。图 10－6 和图 10－7 表示 TSK gel DEAE－5PW 和 SP－5PW 填充柱分别对于核酸（E. Coli RNA）和多肽混合物（激素）的分离。

表 10－2　部分常见的高分子类型高效离子交换色谱填料

名　称	基　质	官能基团	粒度，μm	孔径，nm	应　用
Mono Q	PS－DVB	$-NMe_3^+$	10	80	分离纯化蛋白质等
Mono S	PS－DVB	$-SO_3^-$	10	80	分离纯化蛋白质等
TSK gel SP－5PW	亲水性高聚物	SP	10	100	分离蛋白质、肽、核酸等
TSK gel DEAE－5PW	亲水性高聚物	DEAE	10	100	分离蛋白质、肽、核酸等
TSK gel CM－5PW	亲水性高聚物	CM	10	100	分离蛋白质、肽、核酸等
TSK gel DEAE－NPR	亲水性高聚物	DEAE	2.5	非多孔	快速分离蛋白质、核酸等
TSK gel SP－NPR	亲水性高聚物	SP	2.5	非多孔	快速分离蛋白质、核酸等
TSK gel SCX	PS－DVB	$-SO_3^-$	10		分离氨基酸、碱基、有机酸、糖类

续表

名　称	基　质	官能基团	粒度，μm	孔径，nm	应　用
TSK gel SAX	PS－DVB	$-NR_3^+$	10		分离氨基酸、碱基、有机酸、糖类
Macrosphere/R DEAE	HEMA 共聚物	DEAE	10	35	分离蛋白质等
Macrosphere/R QAE	HEMA 共聚物	QAE	10	35	分离蛋白质等
Macrosphere/R CM	HEMA 共聚物	CM	10	35	分离蛋白质等
Macrosphere/R SB	HEMA 共聚物	SB	10	35	分离蛋白质等
Bio－Gel MA7P	高聚物	PEI	7	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等
Bio－Gel MA7C	高聚物	CM	7	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等
Bio－Gel MA7S	高聚物	SP	7	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等
Bio－Gel MA7Q	高聚物	$-NR_3^+$	7	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等
PL－SAX	PS－DVB	$-NR_3^+$	8,10	100、400	分离蛋白质等
PL－SCX	PS－DVB	$-SO_3^-$	8,10	100、400	分离蛋白质等
Hydrophase PEI	高聚物	PEI	10	50	分离蛋白质等
Hydrophase CM2	高聚物	CM	10	50	分离蛋白质等
Hitachi Gel 3011－N	PS－DVB	$-NR_3^+$	10～15		分离核苷酸、有机酸、糖类等
Hitachi Gel 3011－S	PS－DVB	$-SO_3$	10～15		分离核酸碱基、氨基酸等
Hitachi Gel 3015－C	PS－DVB	－COOH	10～15		分离胺类等
BIO－10	PS－DVB	$-SO_3^-$	5		分离酸性肽类等
BIO－20	PS－DVB	$-SO_3^-$	5		分离碱性肽类
Benson BA－X	PS－DVB	$-NE_3^+$	7～10		分离氨基酸、糖类等
Benson BC－X	PS－DVB	$-SO_3^-$	7～10		分离氨基酸、肽类等
Benson BCOOH	聚丙烯酸酯类	－COOH	7～10		分离蛋白质、药物等
Aminex HPX87 系列	PS－DVB	阳离子型	9		分离糖类、有机酸、醇类等
Aminex HPX42 系列	PS－DVB	阳离子型	9		分离寡糖等

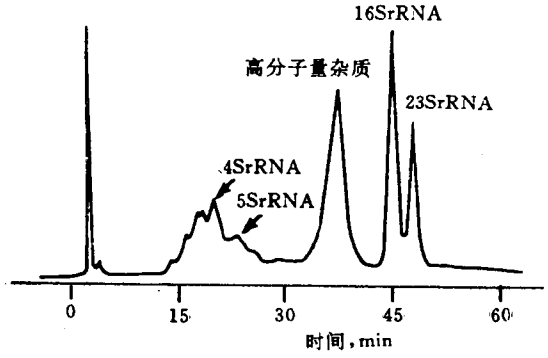


图 10－6　E. coli RNA 的 IEC 分离

分离柱：TSK gel DEAE－5PW(75mm×7.5mm)；

淋洗液 A：0.1mol/L Tirs－HCl＋0.3mol/L NaCl (pH7.6)；

淋洗液 B：0.1mol/L Tirs－HCl＋1mol/L NaCl (pH7.6)；

梯度：线性 A→B(300min)；　流速：1.0ml/min；

检测：UV260nm；

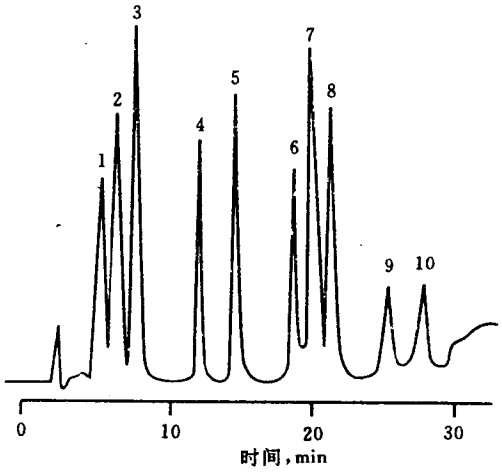


图 10－7　激素类型多肽的 IEC 分离

分离柱：TSK gel SP－5PW(75mm×7.5mm)；

淋洗液 A：0.02mol/L，磷酸盐/乙腈(70/30)(pH3.0)；

淋洗液 B：0.5mol/L，磷酸盐/乙腈(70/30)(pH3.0)；

梯度：线性 A→B(30min)；　流速：1.0ml/min；

检测：UV220nm；

样品：1—催产肽；2—脑啡肽；3—TRH；4—α－内啡肽；5—LHRH；6—神经降压素；7—α－MSH；8—血管紧张肽Ⅱ；9—P 物质；10—β－内啡肽

一种以高聚物为基质的阴离子交换复合树脂已在我国研制成功[50]，这种粒度为 10μm 左右、交换容量为 0.25ml/g 的树脂作为高效柱填料，在柱效、选择性、分离度、穿透性、回收率以及流速适应范围等方面也均表现出了优异的特征，对于蛋白质、多肽以及基因工程药物等均有良好的分离作用。图 10－8 表示一些蛋白质混合样品在该复合树脂填充柱上的分离。

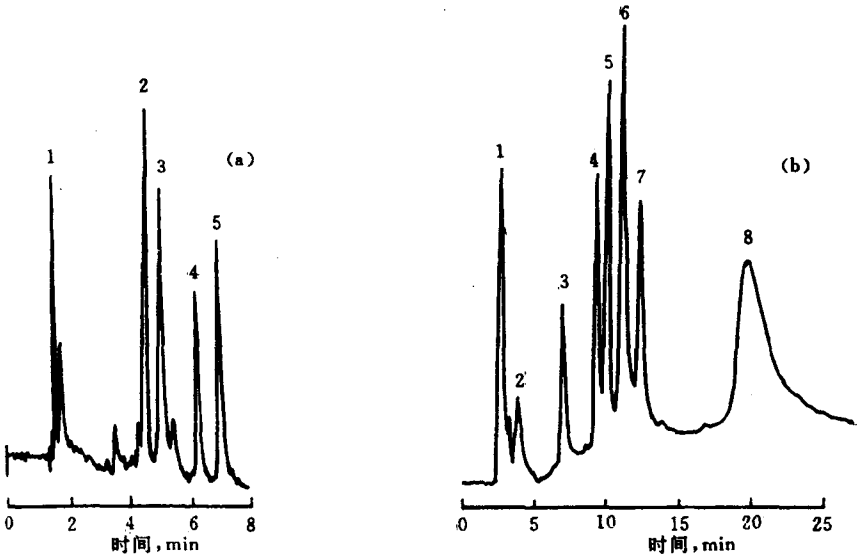


图 10－8　阴离子交换复合树脂对蛋白质的分离

分离柱：阴离子交换复合树脂填料(100mm×8mm)

淋洗液 A：25mmol/L Tris－HCl(pH8.0)

淋洗液 B：A＋1mol/L NaCl(pH8.0)

梯度：线性 A→B(10min)　　流速：(a)1.5ml/min，(b)1.0ml/min

检测：UV280nm

样品：(a) 1—碳酸酐酶；2—卵清蛋白；3—牛血清蛋白；4，5—细胞色素 C；

(b) 1—肌红蛋白；2—胰岛素；3—纤维蛋白原；4—牛血清蛋白；

5—肌酸激酶－BB；6，7—细胞色素 C；8—溶菌酶

近年来，非多孔结构类型填料的开发与应用在离子交换色谱中表现得更为突出。高分子类型非多孔的 IEC 填料主要包括有亲水性高聚物基质的[51～93]，交联聚苯乙烯基质的[54,55]、交联琼脂糖基质的[56]等。目前已出现了许多包括分析柱和制备柱在内的商品。用作高效分离柱的非多孔型填料，一般粒度只有几个微米，颗粒小而均匀，刚性良好，色谱穿透性强，流速适应范围宽。由于非多孔结构可以有效地避免溶质在固定相内部的吸附与扩散，所以对于改善色谱柱效、提高样品回收率以及保持大分子溶质的生物活性都是很有利的。这类填料普遍有很高的柱效、分离度和样品回收率，尤其适合于快速地分离活性生物大分子。例如，在非多孔型交联琼脂糖基质的 IEC 柱上，使用快速淋洗可使一些蛋白质混合样品得到满意的分离(见图 10－9)[56]。在 TSK gel DEAE－NPR 柱上分离 DNA 的碎片如图 10－10 所示，样品是 pBR322－DNA－Hae Ⅲ 的水解物，它包含有 7～587 个碱基对的 22 个碎片。当然非多孔型填料的样品负载量都比较低，但它的优越性却十分显著，尤其在微量技术和痕量分析方面将会有广阔的发展前景。

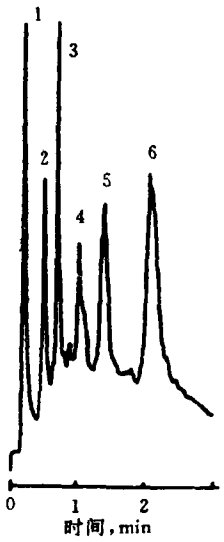


图 10－9　非多孔型 IEC 填料对蛋白质的分离

分离柱：非多孔琼脂糖基质 IEC 填料(62mm×6mm)

淋洗液 A：0.01mol/L Tris－HCl(pH8.5)

淋洗液 B：A＋0.2mol/L 醋酸钠(pH8.5)

梯度：线性 A→B 体积 10ml；　流速：4ml/min

检测：UV 280nm

样品：1—肌红蛋白；2—血红蛋白；3—铁传递蛋白；4—卵清蛋白；5—牛血清蛋白；6—藻红素

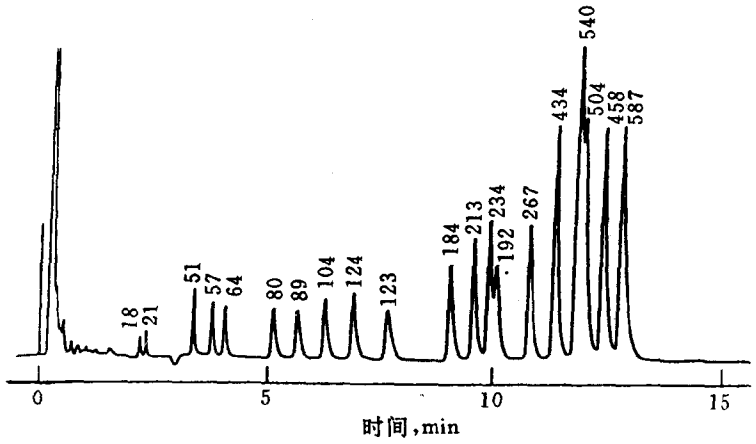


图 10－10　非多孔型 IEC 填料对核酸碎片的分离

分离柱：TSK gel DEAE－NPR (35mm×4.6mm)

淋洗液 A：20mmol/L Tris－HCl(pH9.0)

淋洗液 B：A＋1mol/L NaCl(pH9.0)

梯度：线性 25%→45%B(0.1min)→50%B(2.9min)→100%B(57min)

流速：1.5ml/min；　检测：UV 260nm

二、高效离子色谱填料

离子色谱(Ion Chromatography，IC)方法出现于 70 年代中期，现已形成一个独立的色谱分支。该方法的建立与发展主要依赖于高灵敏电导检测器的应用、高柱效低交换容量分离柱填料的产生以及消除淋洗背景离子干扰技术的进步。由于 IC 方法能够快速灵敏地测定各种痕量的阴阳离子型物质，解决了离子交换色谱以及其它方法所不能解决的分析检测问题，因而在环境部门、生产部门(如能源、资源、材料、水质、食品、医药、农业等)以及包括生命科学在内的许多基础研究领域中得到极其广泛的应用[57~59]。到 80 年代，离子色谱的发展速度甚至超过了 HPLC 技术的其它各个分支。

常见的离子色谱一般有单柱系统[60]和双柱系统[61]之分。前者是将分离柱直接与检测器连接，后者则是在分离柱与检测器之间连接一个用以消除本底电导的抑制系统。早期的抑制系统常使用一根具有相反离子交换作用的高交换容量的填充柱，后来逐渐发展成可以自动再生的纤维抑制柱和薄膜抑制柱。

在双柱 IC 方法中，所使用的填料当首推 Dionex 的 AS 系列(阴离子分析柱)和 CS 系列(阳离子分析柱)。它们都是以交联聚苯乙烯为基质的具有薄壳结构的离子交换剂。以阴离子分离柱填料为例，它是借助于阴阳离子之间的库仑引力，将季胺化的交联聚苯乙烯胶乳附聚在表面被磺化了的交联聚苯乙烯基质微球上，形成一种薄壳结构的阴离子交换附聚树脂。这种填料具有优异的色谱性能，如图 10－11 所示，在适当的淋洗条件下，可使 36 种无机和有机的阴离子得到成功的分离[62]。

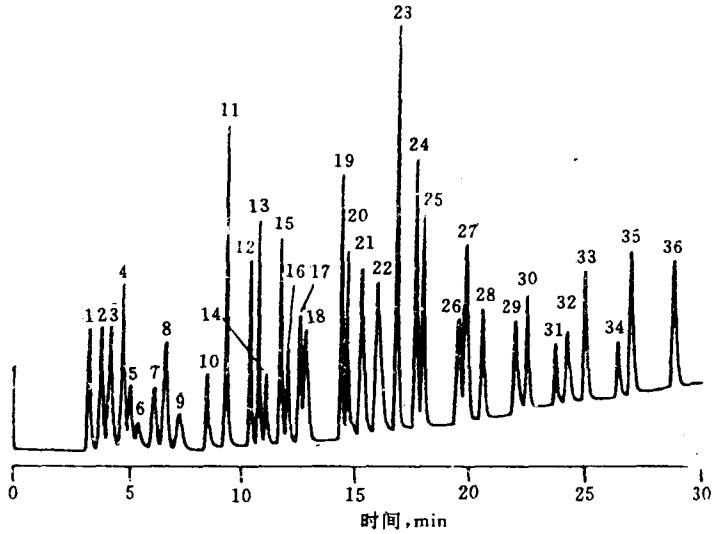


图 10－11　无机与有机阴离子在离子色谱上的分离

分离柱：Dionex HPIC－AS5A　　梯度：线性 100%A(5min)→30%B(10min)→86%B(20min)

淋洗液 A：0.75mmol/L NaOH　　流速：1.0ml/min　　检测：电导

淋洗液 B：100mmol/L NaOH

样品：1—F^-；2—α－羟基丁酸；3—乙酸根；4—苷醇酸酯；5—丁酸根；6—葡萄糖酸根；7—α－羟基戊酸根；8—甲酸根；9—戊酸根；10—丙酮酸根；11—氨乙酸根；12—BrO_3^-；13—Cl^-；14—半乳糖醛酸根；15—NO_2^-；16—葡萄糖醛酸根；17—二氯乙酸根；18—三氟乙酸根；19—亚磷酸根；20—亚硒酸根；21—Br^-；22—NO_3^-；23—SO_4^{2-}；24—草酸根；25—硒酸根；26—α－氧代戊二酸根；27—反丁烯二酸根；28—邻苯二甲酸根；29—草乙酸根；30—PO_4^{3-}，31—AsO_4^{3-}；32—CrO_4^{2-}；33—柠檬酸根；34—异柠檬酸根；35—顺乌头酸根；36—反乌头酸根

单柱 IC 方法所使用的柱填料一般都是低交换容量的多孔性离子交换剂、早期的单柱离子色谱填料就是用多孔树脂 XAD 经浅度离子化而制得的，目前较为广泛应用的填料如 TSKgel IC－Anion－PW 和 TSK gel－IC－Cation，其交换容量分别为 30±3μeq/ml 和 12±3μeq/ml。

IC 方法作为一种痕量分析技术，成功的解决了长期以来在分析化学上视为重大难题的痕量阴离子的分析检测问题。随着柱填料的发展和检测技术的进步(包括其它高灵敏度检测器的

应用),IC 方法已不仅仅限于测定一些常见的阴阳离子型物质,从分析对象来看,已步入生化领域,例如用于分析氨基酸、有机酸、有机胺、核苷、核苷酸、碱基、单糖、寡糖等,均有特色;从分析方法来看,又派生出了离子排除色谱和流动相离子色谱等新的分支。

近年来我国的离子色谱技术及其相应的填料也得到了发展[59,63~68]。例如 Sinopak－L－01A 填料用于痕量阴离子分析具有甚为良好的性能。前面所述的阴离子交换复合树脂[50],其中等交换容量的产品可用作蛋白质的 IEC 分离,低交换容量的产品可用作糖类分析的 IC 填料。

第七节　高分子类型空间排除 HPLC 填料

空间排除色谱(Size Exclusion Chromatography,SEC)方法,通常是一种对于分子量大于 2000 的物质按其分子尺寸大小进行分离的技术。作为 HPLC 技术的一个重要分支,SEC 方法最广泛的用途是测定合成聚合物的分子量分布;对于某些大分子样品如蛋白质、核酸等,也是一种很有效的分离纯化手段。SEC 方法能简便快速地分离那些样品组分中分子量相差较大的简单混合物。它非常适合于未知样品的初步探索分离,无需进行复杂实验就能获得样品组成分布方面较为全面的概况。

SEC 方法按其淋洗体系通常分为两大类,即水相 SEC(也称凝胶过滤色谱)和有机相 SEC(也称凝胶渗透色谱)。两种方法的分离原理虽然是相同的,但柱填料及其分离对象和使用技术完全不同。

一、SEC 填料的一般特征与色谱指标

在 SEC 方法中,柱填料的性质必须与溶质和淋洗体系相匹配。欲分离的高分子样品可能是油溶性的,也可能是水溶性的,前者只能在有机相体系中分离,后者只能在水相体系中分离,填料必须能被淋洗剂所浸润。SEC 方法要求填料与试样尽可能不发生任何基团之间的相互作用,即在色谱过程中应尽可能避免非空间排除效应(如吸附、离子交换、分配等相互作用)的影响,而是完全按照分子尺寸大小进行分离。填料的多孔结构是 SEC 方法赖以建立的基础。有关填料的孔结构参数(如孔度、孔径、孔径分布以及孔结构形态等)对于 SEC 技术来说尤为重要。

一种高效的 SEC 填料,它的化学结构应当能很好地适应欲分离对象和淋洗体系,并能有效地避免非空间排除现象的发生;它的物理结构除了具备均匀而合适的颗粒度外,还需要有光洁的表面(包括孔壁表面)、规整而通畅的孔结构形态、较大的孔度以及适当的孔径大小与分布。

SEC 填料的色谱表征,除了前面所述的柱效、选择性、分离度、穿透性等参数以外,还需满足如下三项色谱指标要求。

1. 排除极限

表示填料可以用来分离高分子物质的最大限度,超过这个限度溶质就会在填料的粒隙间穿过而没有分离效果。排除极限主要取决于填料最大的有效孔径。

2. 分离范围

表示填料可以分离高分子物质的分子量范围。它一般指分离柱的分子量-淋洗体积校正曲线的线性部分。分子量高于和低于这个范围的溶质分别被排除和渗透,均没有分离效果。分离范围主要取决于填料有效孔的分布范围。对于高分子类型 SEC 填料,分离范围通常以相差 2

个数量级的分子量为宜。

3. 固流相比

指填料的有效孔内体积与填料的颗粒间隙体积之比值。它反映了色谱柱的分离容量，其值越大越好。在紧密填充的条件下，固流相比主要与填料的孔度有关。

以上所述，既是填料在制备过程中的主要研究内容，也是填料在应用过程中的重要参考依据。

二、高效凝胶渗透色谱填料

凝胶渗透色谱(Gel Permeation Chromatography，GPC)方法，通常都是在有机溶剂(如THF)淋洗体系中进行，与之相匹配的填料是疏水性的，其分离对象一般是油溶性的高分子物质。

高分子类型GPC填料目前基本上还是以交联共聚的苯乙烯-二乙烯苯多孔微球为主。这类填料的孔径大小与孔的形态因其致孔方法不同而异。单纯由交联网络所决定的孔一般都是均匀的微孔，这种结构均匀的产品呈透明状；结构半均匀的填料是使用良溶剂致孔而聚合的，产品呈半透明状，排除极限可达 5×10^5 聚苯乙烯分子量；结构非均匀的填料通常是用非良溶剂致孔的，由于聚合反应一开始就产生相分离，形成了由交联聚合体小颗粒堆积而成的大孔，产品呈乳白色，排除极限可高达 10^7 聚苯乙烯分子量。

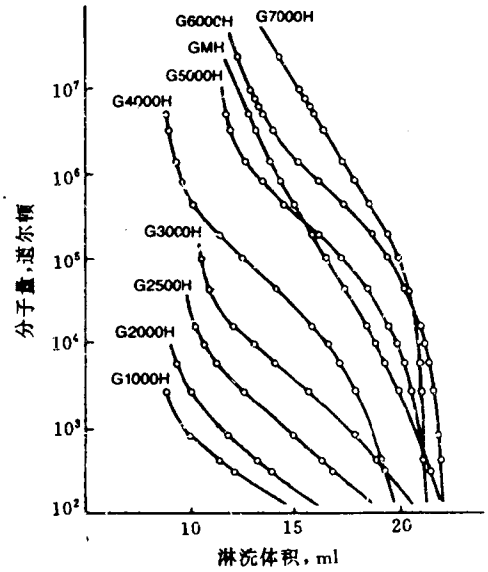


图 10－12　GPC 分离柱的分子量-淋洗体积校正曲线

分离柱：TSK gel HXL(300mm×7.8mm)
淋洗液：THF；　流速：1.0ml/min
检测：RI；　样品：聚苯乙烯

研究表明[69]，在GPC中溶质的传质阻力与高分子填料颗粒内部无规分布的位垒和复杂的孔结构密切相关。由于填料颗粒内部高聚物超微结构粒子堆积的不均匀性而使多孔骨架弯曲所产生的障碍作用，将是影响色谱行为的主要因素。所以致孔技术是合成凝胶色谱填料至关重要的研究内容。

交联聚苯乙烯多孔微球作为高效的GPC填料已有许多商业化产品，如μ－Spherogel系列，Shodex GPC－A、－H、－KF系列，PL－Gel系列、TSK gel－H、－HXL系列，Styragel系列、HSG系列等等。这些填料大都是10μm左右粒度均匀的微球；颗粒机械强度良好，可以在较高

流速和压力下使用；它们一般都有每米塔板数上万甚至数万的柱效。图 10－12 给出了 TSK gel HXL 系列填料对于聚苯乙烯标样的分子量-淋洗体积校正曲线。从曲线可以得到不同孔径尺寸 GPC 填料的排除极限、分离范围和固流相比。交联聚苯乙烯的 GPC 填料大都可以用来分离合成的高聚物、齐聚物，也可用于较小分子量的物质，例如较小孔径的 TSK gel G1000HXL 凝胶可使分子量 92～391 的邻苯二甲酸酯类等混合样品在较短的时间内得到良好的分离。

三、高效凝胶过滤色谱填料

凝胶过滤色谱(Gel Filtration Chromatography，GFC)方法是在水相淋洗体系中，对于水溶性大分子化合物按其分子尺寸大小进行分离的一种 HPLC 技术。

水溶性物质尤其是高分子量水溶性化合物的分离，在生命科学和材料科学的发展中具有极其重要的意义。虽然前面所介绍的几种 HPLC 技术对于此类问题的解决都是有特色的，但是在溶质分子量相差较大的情况下，GFC 方法仍是目前最简便的一种分离手段，尤其被广泛用于初级分离。

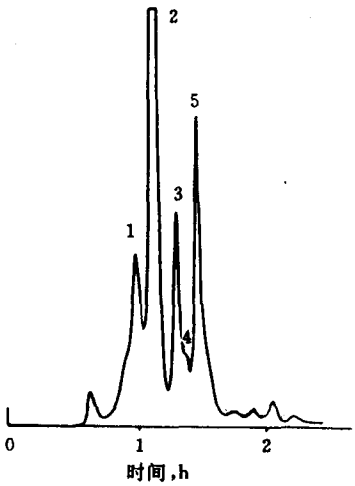


图 10－13　骨髓瘤血清 IgA 的 GFC 分离

分离柱：Superose 6（300mm×10mm）

淋洗液：0.05mol/L 磷酸盐＋0.15mol/L NaCl（pH2.0）

流速：0.2ml/min；　检测：UV280nm

样品：1—IgA 高聚体；2—IgA 二聚体；3—IgA 单体

4—IgG；5—白蛋白

常见的普通 GFC 分离介质基本上都是以有机高分子为基质的亲水性软凝胶，如葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等。这些软质凝胶虽然目前仍被广泛用作生化物质的层析介质，但是它们不能经受压力，难以实现高效快速分离。

70 年代中期以来，高效 GFC 得到了迅速发展。随着合成技术的进步，以有机高分子为基质的高效 GFC 填料相继出现。例如含有亲水性基团的甲基丙烯酸类共聚物树脂[70～73]、交联聚乙烯醇类树脂[74～76]、被亲水性基团衍生的或者有亲水性单体参与共聚的交联聚苯乙烯类树脂[77～79]、羟基化的聚醚树脂[80,81]以及高交联的琼脂糖树脂[82,83]等等。表 10－3 列出了一些常见高分子类型的高效 GFC 填料。这些填料一般都具有良好的亲水性，它们的颗粒均匀，耐压性较强，孔径尺寸以及由孔径分布所决定的溶质分子量分离范围均较适宜，所以被广泛用于生物大分子和合成水溶性高分子的分离。

表 10－3　部分常见的高分子类型高效凝胶过滤色谱填料

名　称	基质材料	粒度，μm	排除极限或分离范围
Superose 6	高交联琼脂糖	10、13	5000，5×10^6(蛋白质)
Superose 12	高交联琼脂糖	10、13	$<3.3\times10^6$(蛋白质)
OHpak Q－801	聚乙烯醇	10	700(PEG)，1800(多糖)
OHpak Q－802	聚乙烯醇	10	1500(PEG)，5000(多糖)
OHpak B－803	GMA 共聚物	10	2×10^4(PEG)，1×10^5(多糖)
OHpak B－804	GMA 共聚物	10	2×10^5(PEG)，5×10^5(多糖)
OHpak B－805	GMA 共聚物	10	2×10^6(PEG)，5×10^6(多糖)
OHpak B－806	GMA 共聚物	10	1×10^7(PEG)，2.5×10^7(多糖)
Ionpak S－801	磺化 PS－DVB	10～15	1000(多糖)
Ionpak S－802	磺化 PS－DVB	10～15	10000(多糖)
Ionpak S－803	磺化 PS－DVB	10～15	5×10^4(多糖)
Ionpak S－804	磺化 PS－DVB	10～15	5×10^5(多糖)
Ionpak S－805	磺化 PS－DVB	10～15	5×10^6(多糖)
Ionpak S－806	磺化 PS－DVB	10～15	5×10^7(多糖)
Spheron P40	HEMA 共聚物		2×10^4～6×10^4(多糖)
Spheron P100	HEMA 共聚物		7×10^4～2.5×10^5(多糖)
Spheron P300	HEMA 共聚物		2.6×10^5～7×10^5(多糖)
Spheron P1000	HEMA 共聚物		8×10^5～7×10^6(多糖)
Spheron P10000	HEMA 共聚物		$<10^8$(估计值)
TSK gel G2000PW	亲水性高聚物	10	100～5000(PEG)
TSK gel G3000PW	亲水性高聚物	13、6	1000×10^4(PEG)
TSK gel G4000PW	亲水性高聚物	13、10	2000～3×10^5(PEG)
TSK gel G5000PW	亲水性高聚物	17、10	4000～1×10^6(PEG)
TSK gel G6000PW	亲水性高聚物	17、13	4×10^4～8×10^6(PEG)
TSK gel Oligo PW	亲水性高聚物	6	100～5000(PEG)
TSK gel GMPW	亲水性高聚物	17、13	100～8×10^6(PEG)
TSK gel DNA－PW	亲水性高聚物	10	4×10^4～8×10^6(PEG)

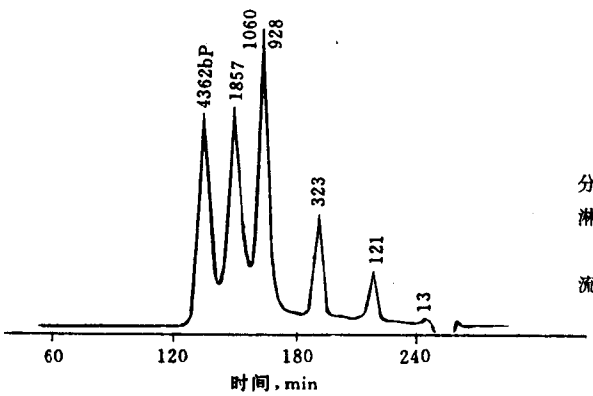


图 10－14　质粒 pBR322 的限制性内切酶 EcoRI 及 BstNI 酶解产物的 GFC 分离

分离柱：TSK gel G－DNA－PW (300mm×7.8mm×4)；
淋洗液：0.1mol/L Tris－HCl(pH7.5)＋0.3mol/L NaCl＋1mmol/L EDTA；
流速：0.15ml/min；　检测：UV260nm

GFC 填料一般都含有诸如羟基一类亲水性基团，大孔高交联的琼脂糖凝胶(Superose)就是典型的多羟基高分子，它保持了一定程度天然亲水性材料的特性，对生化物质有良好的适应性，很有利于分离活性生物大分子(如图 10－13)。在合成的亲水性高聚物凝胶中，TSK gel

PW 产品颇有代表性。它主要包含有—$CH_2CHOHCH_2O$—链段，可以认为是一种羟基化的聚醚。这类凝胶作为高效 GFC 填料对于水溶性高分子具有良好的分离性能，图 10－14 给出了一个分离的例子。如前所述，TSKgel PW 作为优良的基质材料，已在高效的 RPC、HIC、IEC 等分支技术中得到极其广泛的应用。

第八节　高分子类型高效亲和色谱填料

亲和色谱(Affinity Chromatography，AFC)作为液相色谱的一个重要分支，对于生物大分子的分离纯化是有特殊意义的。如果说前面所介绍的几种色谱方法都是通用性分离技术的话，那么 AFC 方法则基本上是属于专一性的，前者是根据溶质分子之间在物理化学性质方面的差异所建立的分离方法，后者则利用了生物分子之间特异性相互作用而实现分离的。这种特异性相互作用是活性生物大分子固有的特征，例如酶能与底物、抑制物、辅酶等结合，抗体能与互补的抗原相结合，凝集素能与细胞的表面抗原以及某些糖类相结合，激素能与蛋白及细胞受体形成复合物，基因可与核酸和阻遏蛋白相互作用等等。所以，原则上讲，如果在固相载体上连接一种具有生物特异性的配基，就可以建立一种亲和色谱方法，用于分离与配基相对应的物质。

亲和色谱的显著特点是，具有其它分离技术所不能比拟的高选择性，而且能有效地保持生物大分子高级结构的稳定性，活性样品的回收率也比较高，所以这种技术用于纯化酶、抗体、核酸、辅助因子和各种能识别、贮存和运载具有生化和药理作用物质的蛋白质，用于分离纯化细胞、细胞器和病毒之类超分子结构的物质，用于浓缩和分离稀溶液中的蛋白质，用于生物样品解离常数和平衡常数的以及动力学序列和结合机制的研究等，都是很有意义的[84]。

表 10－4　部分常见的高分子类型高效亲合色谱填料

名　称	基　质	配　基	粒度，μm	主要应用
Affi－Prep 10	高聚物	羟基琥珀酰胺	50	分离伯氨基偶合物等
Bio－Gel Protein A	高聚物	蛋白 A	50	分离纯化抗体等
Affi－Prep Prot. A	高聚物	蛋白 A	40～60	分离纯化免疫球蛋白等
PL－AFC Protein A	高聚物	蛋白 A	10～25	分离纯化免疫球蛋白等
Shodex AF－PAK	高聚物	Cibacron 蓝	15～20	分离纯化酶类等
Shodex AF－PAK	高聚物	半刀豆球蛋白 A	15～20	分离糖类等
TSK gel Chelate－5PW	亲水性高聚物	亚氨基二乙酸	10	分离纯化蛋白质、酶类等
TSK gel Heparin－5PW	亲水性高聚物	肝素	10	纯化蛋白酶、核酸酶类等
TSK gel Blue－5PW	亲水性高聚物	Cibacron 蓝	10	纯化核酸酶、细胞生长素等
TSK gel Boronate－5PW	亲水性高聚物	m－氨基苯基硼酸	10	分离糖蛋白、糖类、转移 RNA 等
TSK ABA－5PW	亲水性高聚物	P－氨基苯甲脒	10	纯化蛋白酶、激酶等

普通常规的 AFC 填料都是以软质凝胶诸如葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺等作为基质材料的。这类填料虽然机械强度差，传质速率低，但在生物化学和生物技术领域中仍被广泛采用。为了满足快速高效分离的需要，近年来以多孔硅胶和合成高分子为基质的高效 AFC 填料伴随整个 HPLC 技术的进步而得到迅速发展。

高分子类型高效 AFC 填料大都是在多孔性的硬质凝胶诸如交联聚苯乙烯(如 PLRP－S、

POROS)、交联聚甲基丙烯酸酯类(如 Spheron)、亲和性高聚物(如 TSK gel PW)等树脂的基础上发展起来的[16,36,85~87]。这类树脂普遍具有均匀的粒度,较大的孔径,良好的刚性,广泛的pH 值适应性等特点,对于亲和色谱的使用甚为适宜,而且高分子材料一般说来对于生物样品都有较为良好的相容性。至于填料的合成,相比之下在高分子基质微球上引入间隔壁和键合配基也是比较容易实现的。

目前高分子类型高效 AFC 填料已得到较为广泛的应用。从使用情况来看,有些填料的色谱性能是十分优异的,例如使用 Protein A POROSM 填充柱(30mm×2.1mm),从 Hybridom 细胞培养上清液中分离 IgG,仅需 80s 就可以获得满意的结果[16]。表 10-4 中给出了一些常见的商品化 AFC 填料。

参考文献

1 H. F. Walton, Anal. Chem., 1980, 52, 15R

2 R. E. Majors, H. G. Barth, and C. H. Lochmuller, Anal. Chem., 1982, 54, 223R

3 G. L. Hagnauer, Anal. Chem., 1982, 54, 265R

4 R. E. Majors, H. G. Barth, and C. H. Lochmuller, Anal. Chem., 1984, 56, 300R

5 H. G. Barth, W. E. Barber, C. H. Lochmuller, R. E. Majors, and F. E. Regnier, Anal. Chem., 1986, 58, 211R

6 H. G. Barth, W. E. Barber, C. H. Lochmuller, R. E. Majors, and F. E. Regnier, Anal. Chem., 1986, 60, 387R

7 J. G. Dorsey, J. P. Foley, W. T. Cooper, R. A. Barford, and H. G. Barth, Anal. Chem., 1990, 62, 324R

8 H. G. Barth, and B. E. Boyes, Anal. Chem., 1990, 62, 381R

9 J. Ugelstad, European Parent 0003905, 1979

10 J. Ugelstad, P. C. Mork, K. H. Kaggerud, T. Ellingsen, and A. Berge, Adv. Colloid Interface Sci., 1980, 13, 101

11 J. W. Vanderhoff, M. S. El-Asser, F. J. Micele, E. D. Sudol, C. J. Tseng, A. Silowanowicz, and H. R. Shen, ACS Polym. Mat. Sci. Eng., 1986, 54, 587

12 K. Nakamura, R. E. Partch, and E. Matijevic, J. Colloid Interface Sci. 1984, 99-1,118

13 M. Colvin, S. K. Chung, M. T. Hyson, M. Chang, and W. K. Rhin, J. Polym. Sci., Part A:Polym. Chem., 1990, 28, 2085

14 柴志宽等. 中国专利 CN86101723A

15 T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1991, 544, 257

16 N. B. Afeyan, S. P. Fulton, and F. E. Regnier, J. Chromatogr., 1991, 544, 267

17 施良和. 凝胶色谱法. 北京:科学出版社, 1985 年

18 P. A. Bristow, and J. H. Knox, Chromatographia, 1977, 10, 279

19 J. V. Dawkins, N. P. Gabbott, L. L. Lloyd, J. A. McConville, and F. P. Warner, J. Chromatogr., 1988, 452, 145

20 N. Tanaka, T. Ebata, K. Hashizume, K. Hosoya, and M. Araki, J. Chromatogr., 1989, 475, 195

21 K. Yasukawa, Y. Tamura, T. Uchida, Y. Yanaglhara, and K. Noguch, J. Chromatogr., 1987, 401, 129

22 D. P. Lee, J. Chromatogr., 1988, 443, 143

23 G. P. Rozing, and H. Goetz, J. Chromatogr., 1989, 476, 3

24 邓礼儒, 苏天升, 王玉梅. 分析化学. 1982, 10, 82

25 苏天升, 邓礼儒. 中国专利 85100893.3

26 苏天升, 孟庆成, 王玉梅. 化学通报. 1982, (7), 13

27 S. Hjerten, K. Yao, K. O. Eriksson, and B. Johansson, J. Chromatogr., 1986, 359, 99

28 S. Hjerten, K. Yao, S. Q. Liu, D. Yang, and B. L. Wu, J. Chromatogr., 1986, 354, 203

29 Y. Kato, T. Kitamura, and T. Hashimoto, J. Liq. Chromatogr., 1986, 9, 3209
30 Y. Kato, T. Kitamura, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1986, 360, 260
31 R. W. Stout, H. J. Leibu, A. T. Rousak, and R. C. Wright, J. Chromatogr., 1989, 476, 21
32 S. Hjerten, and J. Liao, J. Chromatogr., 1988, 457, 165
33 D. P. Lee, J. Chromatogr. Sci., 1984, 22, 327
34 J. Richey, Methods Enzymol., 1984, 104, 223
35 M. A. Rounds, W, D. Rounds, and F. E. Regnier, J. Chromatogr., 1987, 397, 25
36 L. L. Lloyd, J. Chromatogr., 1991, 544, 201
37 Y. Koto, K. Nakamura, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1984, 294, 207
38 Y. Kato, K. Nakamura, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1983, 266, 385
39 O. Mikes, P. Strop, Z. Hostomska, M. Smrz, S. Slovakova, and J. Coupek, J. Chromatogr., 1984, 301, 93
40 D. J. Burke, J. K. Duncan, C. Siebert, and G. S. Ott, J. Chromatogr., 1986, 359, 533
41 A. Sugii, and K. Harada, J. Chromatogr., 1991, 544, 219
42 P. G. Stanton, R. J. Sinpson, F. Lambrou, and M. T. W. Hearn, J. Chromatogr., 1983, 266, 273
43 B. Pavlu, U. Johansson, C. Nyhlen, and A. Wichman, J. Chromatogr., 1986, 359, 449
44 P. Clezardin, J. L. McGegor, M. Manach, H. Boukerche, and M. Dechavanne, J. Chromatogr., 1985, 319, 67
45 D. L. Crankshaw, C. L. Crankshaw, and A. D. Husby, Biochromatography, 1987, 2, 196
46 Y. Bouriotis, A. Zefeiropoulos, and Y. D. Clonis, Anal. Biochem., 1987, 160, 127
47 Y. Kato, K. Nakamura, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1983, 266, 385
48 Y. Kato, T. Kitamura, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1985, 333, 93
49 T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1991, 544, 249
50 苏天升，李世贵，胡喜章. Anal. Sci., 1991, 7 Supplement, 191
51 Y. Kato, T. Kitamura, A. Mitsui, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1987, 398, 327
52 Y. Kato, S. Nakatani, T. Kitamura, A. Onaka, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 1990, 513, 384
53 Y. Kato, Y. Yamsaki, A. Onaka, T. Kitamura, T. Hsahimoto, T. Murotsu, S. Fukushige and K. Matsubara, J. Chromatogr, 1989, 478, 264
54 M. A. Rounds, and F. E. Regnier, J. Chromatogr., 1988, 443, 73
55 李世贵，苏天升. 色谱. 1991, (5): 281
56 J. Liao, and S. Hjerten, J. Chromatogr., 1988, 457, 175
57 D. T. Gjerde, and J. S. Fritz, Ion Chromatography, 2nd ed., Huethig:Mamaroneck, NY, 1987
58 R. E. Smith, Ion Chromatography Applications, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1988
59 牟世芬，刘开禄. 离子色谱. 北京:科学出版社，1986年
60 T. Jupille, Chromatogr. Sci., 1987, 37, 23
61 E. L. Johnson, Chromatogr. Sci., 1987, 37, 1
62 R. D. Rocklin, C. A. Pohi, and J. A. Schibler, J. Chromatogr., 1987, 411, 107
63 苏天升，袁中利，胡喜章，孟庆成，邓礼儒. 化学通报. 1985, (9): 13
64 苏天升，胡喜章，周凤祥，郝晶慧. 科学通报. 1987, 32, 672
65 苏天升，孟庆成，关幼荣. 分析化学. 1987, 15, 13
66 苏天升，周凤祥，胡喜章，郝晶慧. 化学通报. 1990, (10): 33
67 刘开禄，王秀凤，贺宝华，贾秀兰，赵之兰. 铀矿冶. 1983, (1): 38
68 张新申. 离子色谱分析技术及应用. 成都：四川科技出版社，1986年
69 孟庆成，苏天升，邓礼儒. 科学通报. 1984, 29, 914
70 J. Borak, and J. Coupek, Czechoslovakia Patent CS 192078B Dec., 1982, 17
71 孟庆成，苏天升，邓礼儒. 中国科学，1985, B(2), 97
72 吴淑筠，孟庆成，苏天升，邓礼儒. 分析化学. 1985, 13, 164
73 T. B. Tennikova, D. Horak, F. Svec, J. Kolar, J. Coupek, S. A. Trushin, V. G. Maltsev, and B. C. Belenkii, J.

Chromatogr., 1988, 435, 357
74 Asaki Chemical Industry Co., Lth. Japanese Patent 83109504 A2 June 29, 1983
75 K. Makino, H, Wada, H. Ozaki, T. Takeuchi, H. Hatan, T. Fukui, K. Nogchi, and Y. Yanagihara, Chromatographia, 1985, 20, 713
76 K. Itagaka, H. Kusano, E. Miyata, and T. Tashiro, Jpn. Kokai Tokyo koho, 1988, JP 6317905, 25 Jan; 1988, 6317904, 25 Jan
77 G. Beinert, P. Chaumont, P. Rempp, and J. Herz, Eur, Polym. J., 1984, 20, 837
78 Y. B. Yang, and M. Verzele, J. Chromatogr., 1987, 391, 383
79 P. Chaumont, G. Beinert, J. Herz, P. Rempp, Demande FR 2558473, 26, Jul, 1985
80 Y. Kato, Y. Yamasaki, T. Hashimoto, T. Mursotu, S. Fukushige, and K. Matsubara, J. Chromatogr., 1985, 320, 440
81 H. Sasaki, T. Matsuda, 0. 1shikawa, T. Takamatsu, K. Tanaka, Y. Kato, and T. Hashimoto, Toyosoda Kenkyu Hokoku, 1985, 29, 37
82 S. Hjerten, and K. O. Erikason, Anal Biochem., 1984, 137, 313
83 B. L. Johansson, and L. Aahsberg, J. Chromatogr., 1986, 351, 136
84 C. R. 洛. 亲和色谱导论(刘毓秀译). 北京:科学出版社. 1983年
85 Y. Koto, K. Nakamura, and T. Hashimoto. J. Chromatogr., 1986, 354, 511
86 K. Nakamura, K. Toyoda, and Y. Kato, J. Chromatogr., 1988, 445, 234
87 K. Nakamura, T. Hashimoto, Y. Kato, K. Shimura, and K. Kasai., J. Chromatogr., 1990, 510, 101

第十一章　无机基质分离介质

刘国诠

（中国科学院化学研究所，北京，100080）

在生物工程下游技术中，色谱技术主要用于目标产品的分离纯化以及质量检测和过程分析。不同的目的，有不同的要求。一般而论，分析分离追求的是高效分离和高灵敏度检测，而制备分离则既要考虑分离效率，也要考虑为保证一定纯度的分离所付出的代价，即力争达到最好的性能-价格比。

不同的分离目的需要不同的分离材料。生物工程产品所需要的色谱固定相或介质应当满足下面的条件。

（1）　能达到所需的分离效率；

（2）　进行制备分离时，应不引起分离对象的变性或失活；有较高的回收率和负载量；

（3）　化学及机械性质稳定，能经受使用、清洗、再生和消毒时的恶劣条件。分析及分离结果的重现性要好；

（4）　成本较低，价格合理。

目前市售的介质材料基本上可以满足上述条件，但完全符合上述条件的却是为数不很多。

无机基质分离介质以多孔硅胶为基本材料，此外还可以用可控孔径玻璃（CPG：Controlled pore glass）、氧化铝、氧化锆及羟基磷灰石等。将上述无机材料制成适宜应用的球形或无定形颗粒，经化学键合或涂层法改性后，制成不同分离模式的固定相或介质，以满足不同的分离目的。用于生物工程产品分离、分析的介质，主要有大孔反相、亲水凝胶、离子交换、疏水作用以及亲和介质等不同的类型。本文将就不同基质材料的性质、制法、改性以及不同类型分离介质的现状及发展，分别加以讨论。

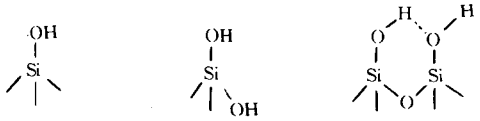
第一节　无机基质

一、硅胶

1. 硅胶的化学性质

硅胶（Silica Gel）的化学成份是二氧 化硅。硅属元素周期表第Ⅳ族元素，原子量为 28.085，外层电子结构为 $3s^2 3p^2$，可以与氧、碳、氮、氢及卤素等形成稳定的共价键。硅在自然界含量丰富，多数以石英和硅酸盐的形式存在。硅和氧化合而形成的二氧化硅 SiO_2 非常稳定，它其实是分子量巨大的无机高分子，砂子、花岗岩的主成份都是 SiO_2。用作分离介质的硅胶是人工合成的多孔二氧 化硅，它的特点是其表面含有硅醇基（Silanol groups or surface hydroxyl groups）$\begin{matrix}\diagdown\\ -Si-OH\\ \diagup\end{matrix}$，这是硅胶可以进行表面化学键合或改性的基础。同时，其多孔的特性导致表面可以存在大量物理吸附水，这更增加了反应的复杂性。

一般认为，硅胶表面的硅醇基（或称硅羟基）可以有 3 种不同类型[1]，即：



自由(或孤立)硅羟基　　孪硅羟基　　邻硅羟基

这3种不同的硅羟基中，以自由硅羟基对各种键合反应最为重要。物理吸附水因为与硅羟基的氢键作用而变得非常稳定，这也是将硅胶用作基质时必须考虑的问题。物理吸附水和表面硅羟基可以用红外光谱和热失重的方法加以区别和测量[2]。当加热至100℃以上时物理吸附水即蒸发，约200℃时硅羟基将开始缩合，形成硅-氧-硅键而放出水：

$$2\text{—Si—OH} \xrightarrow[\Delta]{200℃} \text{—Si—O—Si—} + H_2O$$

这一过程可随温度升高而加剧，至1200℃基本完成。一般情况下，随制造和保存方法的不同，多孔硅胶的总含水量(包括物理吸附水、硅羟基)约为总重的2%～10%，表面硅羟基的浓度最大可达8～9μmol/m²。例如，对于300m²/g的硅胶，这相当于4%w/w[3]的水含量。

硅胶表面的硅羟基浓度，可以用多种方法测定，如甲基锂法[4]、重氢交换后以质谱法测定[5]或用红外光谱法[6]等。而用氢化锂铝反应后，以气相色谱法测定产生的H_2，则兼有方便和准确的优点[7]。

硅胶的化学性质比较稳定，可以耐受酸性介质的侵蚀。无定形硅胶常温下在纯水中的平衡溶解度约为10^{-4}，但是，当pH值升至9以上时，溶解度增大，至pH10.7以上时硅胶即会溶解[8]。为安全计，硅胶一般只用于pH1～8范围内。

在硅胶制备过程中，由原材料及设备产生的微量金属离子杂质常给硅胶成品的化学性质带来意想不到的影响[8]，有可能影响键合的效果，也是造成硅胶非特异性吸附的原因之一，这对其用于生物工程分离介质是不容忽视的问题。

2. 硅胶的物理性质

作为分离材料的硅胶，其颗粒的形状与大小、孔的结构、孔径及其分布、总孔容、比表面积及机械强度等，均是重要的参数。

球形的硅胶更有利于传质，且使柱子的操作压力较低。小而均匀的粒度及粒度分布对液相色谱的高效化有着决定性的作用。目前，最通用的分析型硅胶基质的直径为5～10μm，直径3μm的化学键合相硅胶已有商品出售，而高效制备型所用的硅胶，其直径多在20～40μm之间。

多孔硅胶的孔，可以定义为其深度大于宽度的凹陷。尽管可以把孔归纳为不同的类型，如杯形(圆筒形)、瓶形、裂缝形等等，但有一点是共同的，即它们必须是开放孔，闭孔对分离是没有贡献的。我们通常所说的孔径实际上是个统计的、平均的概念，即平均孔径，它是指累积孔径分布曲线50%处的平均孔径，或是与孔径分布曲线的最高频度相对应的平均孔径[9]。值得注意的是，因测量方法或定义的不同，这一数值会有差异。几十纳米以下孔的平均孔径可以由气体吸附法测得，几纳米至数微米孔的平均孔径可由压汞法测得[10]。在一般高效液相色谱中应用的多是平均孔径6～8nm的硅胶，而对生物工程产品的分离则必须使用中孔或大孔硅胶，例

如平均孔径 30nm 以上或更大孔的硅胶。

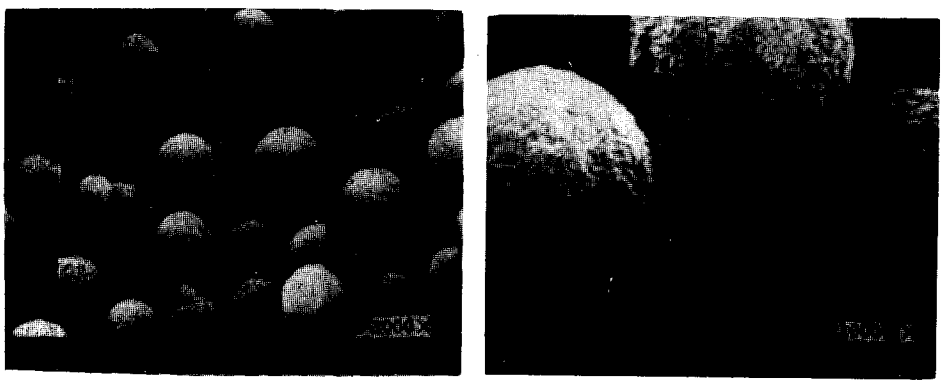
多孔性材料均具有很大的比表面积。如，通常的 6nm 硅胶，其比表面积为 300～400m^2/g；而平均孔径 30nm 的硅胶，其比表面积约为 100m^2/g。一般，比表面积随平均孔径的增大而减小。比表面积决定了分离介质样品负载量的大小。

多孔材料的另一重要物理性质是孔度，即总孔体积与总体积之比。在用作凝胶色谱填料时，孔度是非常重要的参数，直接关系到样品在色谱柱上的保留体积和分辨率。但另一方面，孔度过大，势必影响材料的机械强度，这需要综合加以考虑才行。

高机械强度是硅胶的特点之一。常用的 5μm 直径、6～10nm 孔径的硅胶，可以耐受 60～70MPa 的操作压力；随孔径及孔度的增大，可耐受的压力会降低。当使用 30～100nm 平均孔径的硅胶时，仍可耐受达 30MPa 压力而不破损。但是，对于高孔度的凝胶色谱填料，操作压力只能在 10MPa 甚至更低。

3. 多孔硅胶的制法

可以用很多种方法制备多孔硅胶。最常用的是将水玻璃（即硅酸钠的水溶液）酸化，在一定条件下形成 SiO_2 的胶体溶液，再以各种方法将其聚集成所需球形粒子并转化为干凝胶，即多孔硅胶。此外，利用正硅酸酯的缩聚和 SiO_2 气溶胶水溶液的喷雾干燥法，亦可制成高性能的硅胶[8,11]。



(a)　　(b)

图 11－1　多孔硅胶微球

作为分离材料基质的硅胶，需要有规则的几何形状（例如球形）、适宜的粒子大小及尽可能窄的粒度分布、适宜的孔径及孔径分布、适宜的孔度及比表面积，其中粒度控制是个很棘手的问题。直接制备出粒度单分散的硅胶微球，是人们追求的目标之一，比较成功的方法是通过尿素、甲醛相分离聚合的堆砌硅珠法[12～14]。具体做法是将适当浓度的硅溶胶与一定比例的尿素和甲醛配成水溶液，搅拌均匀令其产生缩聚反应，待反应到一定程度后产生相分离而从水溶液中沉淀出聚集硅微珠与尿素甲醛树脂的复合球。将这种复合球收集、洗涤并在高温炉中煅烧，令树脂分解逸去，剩下的就是多孔硅胶微球，其直径可以控制在 4～5μm 或 7～8μm 之间。这种堆砌硅珠形成的硅胶的孔，主要是由硅微珠间的空隙所构成的，依所用原料而异，一般 20～50nm 直径的硅微珠可以形成 6～10nm 左右的孔。图 11－1 中给出了一种用此种方法合成的

多孔硅胶的扫描电镜照片。此种硅胶可适合于除凝胶色谱以外的所有其它模式色谱固定相的合成之用[15]。

为适应生物高分子的特点，需合成更大孔径的硅胶，用浸无机盐煅烧扩孔[14~18]或热压釜法扩孔均能将其孔径扩大[19]。在以正硅酸酯缩聚法制硅胶时，亦可通过加入惰性致孔剂的方法控制其孔径与孔容，这种多孔硅胶对凝胶色谱是很适用的。

目前，世界上有上百种不同牌号、不同性能规格的多孔硅胶，表 11－1 列出了一些常见的品种以及其物理性质。

表 11－1　硅胶的牌号及性能

商品名称	粒子形状	粒径，μm	孔径 nm	比表面积 m^2/g	生产厂家或公司
Biosil	无定形	2～10			Altex Scientific
Hypersil	球形	5～7	10	200	Shandon
Lichrosob Si60	无定形	5,7,10,30	6	475	E. Merck
Si100	无定形	5,7,10,30	10	278	E. Merck
Lichrospher	球形	5,10,20	12	256	E. Merck
Si100					
Si300	球形	5,10	30	250	E. Merck
Si500	球形	10	50	45	E. Merck
Si1000	球形	10	100	19	E. Merck
Si4000	球形	10	385	4.7	E. Merck
Nucleosi 150	球形	5,7.5,10	50	500	Macherey Nagel
100	球形	5,7.5,10	10	300	Macherey Nagel
Porasil A	球形	37～75;75～125	10	350～500	Wasters Associates
B	球形	37～75;75～125	15	125～250	Wasters Associates
C	球形	37～75;75～125	30	50～100	Wasters Associates
D	球形	37～75;75～125	60	25～45	Wasters Associates
E	球形	37～75;75～125	100	10～20	Wasters Associates
F	球形	37～75;75～125	150	2～6	Wasters Associates
T		12～25;25～37	15	300	Wasters Associates
Shinopak Si100	球形	5,7	10	250～300	中科院化学所
Si300	球形	5,7	30	100	中科院化学所
Si1000	球形	5,7	100	50	中科院化学所
Vydac HS	球形	—	8	500	Macherey Nagel & CO
Vydac TP	球形	10	30	90	Macherey Nagel & CO
YQG Si	球形	5,7	6		青岛海洋化工厂
Zorbax Sil	球形	5～7	7.5	300	Du Pont

二、可控孔径玻璃

一些特定成份的含硼硅酸钠玻璃经热处理后可以产生相分离，以稀盐酸将硼酸钠抽提出后只剩下 SiO_2 部份，可溶部份即成为孔隙。改变玻璃的组成和处理条件，可以控制生成的可控孔径玻璃(CPG)的孔径、孔容和比表面积[20~22]。早期的 CPG 系无定形粉末，现已有珠状产品。

可控孔径玻璃的孔径可自数纳米到亚微米间调整，且其孔径分布窄，机械强度也很高。在我国，由于可以使用硅藻土一类原料，其价格有可能较为低廉[23]，因而有可能成为一种良好的无机分离介质。CPG 可用于许多蛋白质的粗分离，干扰素、肿瘤坏死因子、白细胞介素-Ⅱ以及红细胞生成素等均有所报导[24]，我国亦将 CPG 直接用于 γ-干扰素的提取与分离[25]。

由于可控孔径玻璃的化学成份是 SiO_2，且同样含有丰富的表面硅羟基，因此它可以用与硅胶相同的方法进行化学键合或表面处理，制备各种分离模式的分离介质。

可控孔径玻璃还可作为固定化酶的载体、固相合成的载体以及无机膜分离材料等。

三、其它

Al_2O_3、ZrO_2、TiO_2 以及碳微球等，均曾被研究用以制备耐高 pH 值或具有特殊分离性能的介质。

用作分离材料的氧化铝，主要是 $\gamma-Al_2O_3$，其表面羟基浓度约为 3μmol/m²，孔最大可达 10nm 左右，但常含大量小于 2nm 的孔，其比表面积约为 50～200m²/g[26,27]，作为色谱固定相，主要用于小分子有机物等的分离。限制它更广泛地应用的主要因素是，它难以象 SiO_2 那样通过键合而得到适应不同分离模式的固定相。最近，有人利用 Al—OH 基的氯化反应，再与丁基锂反应生成烷基化氧化铝：

$$\text{Al—OH} + SOCl_2 \longrightarrow \text{Al—Cl} + SO_2 + HCl$$

$$\text{Al—Cl} + n\text{-}C_4H_9Li \longrightarrow \text{Al—}C_4H_9 + LiCl$$

从光谱分析和元素分析可知，丁基键合密度相当于 2.6μmol/m²，所用的原料 Al_2O_3 直径 10μm，比表面积约为 100m²/g。键合相经试验，在甲醇、乙腈、已烷、甲苯等溶剂中可长期使用，在 pH1～12 范围内未见异常。经装柱分离细胞色素 C、醛缩酶、木瓜蛋白酶及尿素酶等蛋白质，各峰均窄而对称，理论塔板数 1.3～1.6 万/m[28]。看来只要解决键合问题，氧化铝有可能发展成为耐受碱性介质的固定相材料。

ZrO_2 可以通过二氯氧化锆($ZrOCl_2$)或烷氧基锆的水解，以及水合二氯氧化锆的热裂解来制备[29]。利用与硅胶键合相类似的方法，可以对氧化锆进行表面修饰。用这种方法制备的键合反相(C_{18})氧化锆，可以用至 pH13；聚合物包覆型亦可达 pH12。含金属铜离子的亲和色谱介质，在 pH10.5 时仍很稳定[85]。以 ZrO_2 作为涂层或添加剂改进硅胶的 pH 值稳定性的工作也获得了某种程度的成功[30,31]。

第二节　硅胶的化学修饰

硅胶本身只能充作正相色谱的填料，它必须经过种种化学修饰才能改变其表面化学性质，成为适用于不同分离模式的色谱填料或分离介质。

硅胶的化学修饰可以大致分为 3 种不同的方式，即整体修饰、通过表面硅羟基的化学修饰

以及涂层法。

一、通过表面硅羟基的化学修饰

前已述及，硅可以与诸多元素形成稳定的共价键，这是形成品种繁多的含硅化合物以及硅胶进行化学修饰的基础。

表 11－2 给出了 Si—O、Si—C、Si—N 等键的有关参数[32,33]。

表 11－2 几种键的有关参数

键	键长，nm	参考化合物	键能，kJ/mol	参考化合物
Si—O	0.160	SiO_2	479	SiO_2
	0.164	$Si(OCH_3)_4$		
Si—C	0.189	$Si(CH_3)_4$	306	$(CH_3)_3SiCl$
	0.185			
Si—N	0.174	$(SiH_3)_3N$	318	$(CH_3)_3Si_2NH$

Si—O 键是很稳定的键，但当溶液 pH 值大于 9 时，则可能发生离解而导致硅胶的破坏；Si—C 键也比较稳定，模型硅烷化合物的热裂解研究表明，它在 800℃时才能完全裂解。而化学键合的硅胶至近 300℃才发生明显的失重[34]。

硅羟基的化学修饰通常可以采用以下 3 种途径。

1. 通过氯化反应

除去了物理吸附水的硅胶，可以将硅羟基转化为活泼的表面硅氯基：

$$\equiv Si—OH \xrightarrow{SOCl_2} \equiv Si—Cl \longrightarrow$$

生成的 Si—Cl 基可以与格氏试剂、有机锂化合物以及有机胺衍生物进行反应，引入相应的烷基或衍生胺基，例如可以引入正丁基、正辛基、十八烷基以及各种芳香基[35]。通过这种方法引入的键合基团，都是单分子层的。

2. 通过氯硅烷与硅羟基的反应

通过氯硅烷可以将各种烷基链引入硅胶表面，特别是引入长链正烷基链或芳香基以制备反相固定相，这在 HPLC 的发展过程中曾起过重要作用。

氯硅烷可以是单氯、二氯或三氯代硅烷，其烷基亦可以是 C_1～C_{18}等。键合反应在无水条件下进行，有时亦加入有机胺催化剂以吸收逸出的 HCl 并活化反应中间体，促使反应更加快速、完全。使用一氯代型试剂，可以得到单分子层键合相。使用二氯代及三氯代型试剂特别是当有水存在时，连接于试剂硅原子上的氯可以进一步水解而形成新的硅羟基，它可以与另外的氯硅烷试剂反应而生成聚合型键合相。

3. 通过烷氧基硅烷与硅羟基的反应

烷氧基硅烷 $(RO)_3SiR'$ 里的 R 一般是 CH_3 或 C_2H_5，R′则可以是不同的基团。反应一般分为两步进行，例如：

$$\equiv Si—OH + (CH_3O)_3Si(CH_2)_3OCH_2CH\overset{O}{\diagdown\diagup}CH_2 \xrightarrow{-CH_3OH} \equiv Si—O—Si\equiv (CH_2)_3OCH_2-CH\overset{O}{\diagdown\diagup}CH_2$$

生成的含有环氧基的硅氧硅烷基可以继续与含有活泼氢的试剂反应，从而使硅胶带上不同的

基团[36]。这一反应中的试剂还可以使用其它类型，如含胺基的烷氧基硅烷[37]，这样反应产物便带有 $-NH_2$ 基，可以很方便地再进一步修饰或反应。此外，这一键合反应可以在水相进行，亦可在有机介质中进行。在有机介质中的键合反应，可以获得较高的键合效率[38]。

二、通过涂层改进硅胶的表面性质

在液相色谱发展的早期，即有人借用气相色谱固定相涂敷的方法将固定相涂到硅胶或可控孔径玻璃的表面，以充作固定相，用于液相色谱分离之用。但是，这样形成的涂层因附着强度不佳，难以耐受较长时间的反复使用，且柱效亦不高。

将高聚物的化学稳定性与硅胶等无机基质的高机械强度结合起来组成“复合”的分离材料，有着良好的应用前景。人们希望通过不同途径来获得稳定的聚合物涂层。较普通的做法是，将选择的聚合物、寡聚物或单体以适宜溶剂制成溶液，均匀分布于无机基质的全部表面上，蒸去溶剂后令高聚物交联或令单体聚合，形成致密的聚合物涂层。这样涂敷的聚合物可以是聚有机硅氧烷，也可以是其它有机聚合物。例如，先在硅胶上通过硅羟基引入活性反应基团，令其与随后涂敷上去的聚合物或单体进行共聚反应。如果第一次键合上去的是含双键的活泼基团则可以进行共聚：

$$\equiv Si-O-Si(\equiv)-CH=CH_2 + n(RCH=CHR') \longrightarrow \equiv Si-O-Si(\equiv)-(CH_2)_2-(CHR-CHR')_n$$

这里的第二单体可以是丙烯腈、丙烯酸、甲基丙烯酸丁酯以及甲基丙烯酸羟丙基酯等[39]。此外，也有人将含双键不饱和的聚合物涂于硅胶表面后，将其以自由基引发进一步的交联，以获得理化性质更稳定的涂层[40]。聚合物涂层法的含碳量可达 8%～20%，其涂层厚度可以通过键合前的基质的比表面积及涂层后重量增量加以计算，据有人报导，约在 0.7～1.4nm 之间[47,48]。

三、整体修饰[8]

利用具有不同官能度的卤代硅烷或烷氧基硅烷的水解、缩聚反应，可以直接制出成空间交联型、含不同 R 基的硅胶，例如：

$$nR-SiX_3 \longrightarrow nR-Si(OH)_3 \longrightarrow (RSiO_{3/2})_n$$

这里的 R 基可以是烷基，亦可以是含有 NH_2- 或 SO_3H- 取代的烷基。

四、硅烷化试剂

表 11-3 列出了一些常用的硅烷化试剂及其主要应用范围。此外，亦有一些实验室和公司研制了另外一些高反应活性的硅烷化试剂，如：

$RR'_2Si-OCOCF_3$　　烷基三氟乙酰氧硅烷

$RR'_2Si-N(CH_3)_2$　　*N*-(有机硅烷基)-*N*,*N*-二甲基胺[42]

$R-Si(CH_3)_2-N(CH_3)COCH_3$[43]

R 为丁基、辛基

以上各种硅烷化试剂的反应活性是不同的，以 $n-C_8H_{17}(CH_3)_2Si-X$ 型为例，其活性顺序为[44]：

$$\equiv Si-N(CH_3)_2 > \equiv Si-OCOCF_3 > \equiv Si-Cl > \equiv Si-OR > \equiv Si-OH$$

而对于常见的氯硅烷，当 R 基相同时，其活性顺序为：

$$RSiCl_3 > R_2SiCl_2 > R_3SiCl$$

表 11－3　常用硅烷化试剂

名　称	分子式	分子量	沸点 ℃/kPa	备　注
三甲基氯硅烷 Trimethylchlorosilane	$(CH_3)_3SiCl$	108.7	57/101.3	残余 Si－OH 封头剂，C_1 相
丁基二甲基氯硅烷 Butyldimethylchlorosilane	$C_4H_9(CH_3)_2SiCl$	150.7	140/101.3	C_4 反相，单层分子键合层
辛基二甲基氯硅烷 Octyldimethylchlorosilane	$C_8H_{17}(CH_3)_2SiCl$	206.7	105/2	C_8 反相，单层分子键合层
十八烷基二甲基氯硅烷 Octadecyldimethylchlorosilane	$C_{18}H_{37}(CH_3)_2SiCl$	346.7	140～145/0.013	C_{18}、ODS 型反相
苯基二甲基氯硅烷 Phenyldimethylchlorosilane	$C_6H_5(CH_3)_2SiCl$	170.5	87/2.4	苯基反相
二甲基二氯硅烷 Dimethyldichlorosilane	$(CH_3)_2SiCl_2$	129.1	70	C_1 反相，单层及多层
二丁基二氯硅烷 Dibutyldichlorosilane	$(C_4H_9)_2SiCl_2$	213.2	212	C_4 反相，单层及多层
正辛基甲基二氯硅烷 *n*－Octylmethyldichlorosilane	$C_8H_{17}(CH_3)SiCl$	227.3	94/4.8	C_8 反相，单层及多层
十八烷基甲基二氯硅烷 *n*－Oct decylmethyldichlorosilane	$C_{18}H_{37}(CH_3)SiCl_2$	367.5	185/0.33	C_{18}、ODS 反相，单层及多层
苯基甲基二氯硅烷 Phenylmethyldichlorosilane	$C_6H_5(CH_3)SiCl_2$	191.1	205	苯基反相
甲基三氯硅烷 Methyltrichlorosilane	CH_3SiCl_3	149.0	66	C_1 反相，多层
丁基三氯硅烷 Butyltrichlorosilane	$C_4H_9SiCl_3$	191.6	142～143	C_4 反相
辛基三氯硅烷 Octyltrichlorosilane	$C_8H_{17}SiCl_3$	247.7	224～226/97.3	C_8 反相
十八烷基三氯硅烷 Octadecyltrichlorosilane	$C_{18}H_{37}SiCl_3$	388.0	160～162/0.4	C_{18}反相
苯基三氯硅烷 Phenyltrichlorosilane	$C_6H_5SiCl_3$	211.6	201	苯基反相
环氧丙氧基丙基三乙氧基硅烷 3－Glycidoxydrodyltriethoxysilane	$(C_2H_5O)_3Si(CH_3)_2-OCH_2CH\overset{O}{\diagup\diagdown}CH_2$	263.3	260～226	凝胶、离子交换、疏水亲和等
氰基乙基二甲基氯硅烷 Cyanoethyldimethylchlorosilane	$(CNC_2H_4)(CH_3)_2SiCl$	146.6	83/2.4	CN 键合正相，离子交换
氨丙基三乙氧基硅烷 Aminopropyltriethoxysilane	$NH_2(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$	221.4	122～123/4	键合正相，离子交换、亲和
γ－甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷 Methacrylpropyltrimethoxysilane	$CH_2=\overset{CH_3}{\overset{\vert}{C}}COO(CH_2)_3-Si(OCH_3)_3$	248.3		复合介质
γ－巯基丙基三乙氧基硅烷 Mercaptopropyltriethoxysilane	$HS(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$	238.3		亲和、疏水等
六甲基二硅氮烷 Hexamethyldisilazane	$(CH_3)_3SiNHSi(CH_3)_3$	151.3		残余 Si－OH 基封头

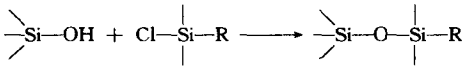
表 11－3 中列出的硅烷化试剂中，烷氧基硅烷似乎种类不多，但是它们含有的环氧基、氨基、巯基、乙烯基或丙烯基等却可以进一步反应，从而制备出种类繁多的色谱固定相。这些烷氧基硅烷作为表面处理剂，在我国已经研制成功并投入了生产[45]。

第二节　反相介质

在各种色谱分离模式中，反相仍是最常用的方法。粗略的统计表明，在色谱领域各种应用中反相占 57%。

一、反相介质的合成

选择具有适宜粒度和孔特性的硅胶，经表面硅烷化反应或以涂层的方式包上一层聚合物，便可制备出反相介质(Reversed Phase Packings)。常规制取反相介质的工艺已很成熟，



式中硅烷化试剂如前述，R 可以是不同碳链长度的烷基(C_4、C_8、C_{18}等)，也可以是芳香基团，如苯基。图 11－2 给出了一个模式反应流程图。

硅胶的预处理：经常以 0.1mol/L HCl 于 90℃下处理 24h，亦可在 10%盐酸内回流洗涤 8h。这一步的目的是将硅胶中的痕量金属离子杂质洗去并使表面形成足够浓度的硅羟基。处理好的硅胶洗至近中性或无 Cl^- 为止，置真空烘箱内 200℃或 250℃加热，以调整其表面硅羟基浓度，并令表面物理吸附水完全逸出。

所用的硅烷化试剂一般无需特殊处理，但如使用三官能试剂时，长时间贮存会发生轻微聚合现象，此时应进行真空减压蒸馏后方可使用。所用溶剂应充分干燥(最好以金属钠干燥)，并过滤后使用。反应装置应装有搅拌器、带有干燥管的回流冷凝管以及干燥惰性气体的通入管。反应开始前，应将硅胶置反应器内，于 150～200℃下抽真空(13.3Pa)2h 以上，冷至室温后，通过分液漏斗真空加料(硅烷化试剂、催化试剂及溶剂)，以使试剂溶液进入硅胶孔内。在以甲苯为反应溶剂时，需加热反应 18h 以上才能达到较高键合率。反应后，应充分洗涤并干燥，以类似的工艺进行残余硅羟基的“封头”处理，即以高反应活性的小烷基硅烷化试剂将残余硅羟基反应掉，这对于生物高分子的分离是十分重要的。

常用的封头试剂为三甲基氯硅烷(TMS)和六甲基二硅氮烷(HMDS)。由于有报导说 HMDS 会导致已键合结构的破坏，故宁可使用 TMS 更为妥当。

上述反应程序，是无水有机溶液体系的一般方法。如果使用三烷氧基硅烷为键合试剂，则反应需有少量水(例如 10^{-4}数量级)为催化剂。

一个较理想的工艺应具有低消耗、高效率、产品质高而稳定、操作条件宽容度好的特点。近年来，反相合成工艺虽已很成熟，但工艺改进仍未停止，一个有前途的工艺是沸腾床合成法[49～52]。利用干燥的 N_2，使反应器内的硅胶流态化，加热成蒸气的硅烷化试剂被 N_2 携带进入反应器，于一定温度下与流态化的硅胶充分接触并反应。气相反应后，N_2 和 HCl 通过回流冷凝管逸去，而硅烷化试剂则可回收循环使用。这一方法效率高，速度快，无溶剂消耗且有不同批次间重复性好的优点，特别是对于制备级分离介质的合成，是一个很有前途的方法。

聚合物涂层反相介质已经商品化，但采用的聚合物的种类和结构尚不得而知。从耐受 pH 值范围约 1～12 看来，有可能是不含硅的高分子化合物。

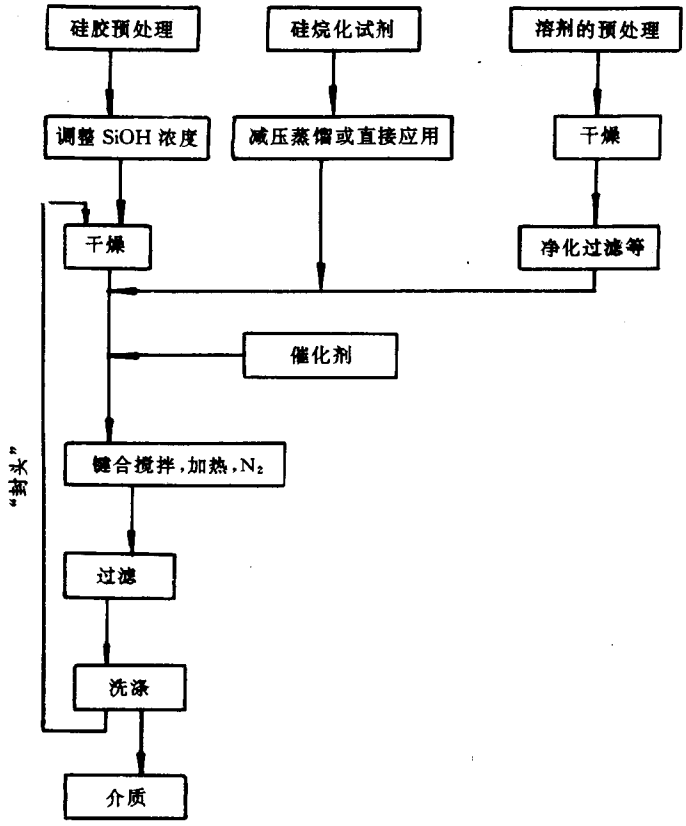


图 11－2　反相介质的合成

为降低使用成本，有人提出了反相色谱柱的原位键合法[53,54]，这一方法可用于反相色谱柱的再生。

二、反相介质的表征与评价

在介质材料的诸多特性中，人们最关心的是介质装柱后的柱效、选择性、稳定性、不同批次间的重复性以及用作生物高分子分离时的生物相容性及回收率等。这些特性，都与介质本身的物理化学性质密切相关。

对反相介质进行表征与评价的目的，在于确认其结构及物理、化学特性，从而建立起其物理、化学特性与色谱性能的关系，指出控制与改进其结构与性能的途径，并对设计新型的固定相起指导作用。

1. 配基键合密度与残余硅羟基浓度

前面已介绍过，硅胶表面硅羟基的浓度约为 $8\mu mol/m^2$。在反相介质键合过程中，由于位阻效应等原因，最多仅有约 50%多一些的表面硅羟基被修饰，尚有近 50%的硅羟基残留。这些硅羟基可以导致色谱峰拖尾，使蛋白质样品失活以及因其具有的弱酸性而造成的分离模式的复杂化。

一些文献中经常以碳含量来表征其表面硅羟基被修饰的程度。但是，因硅胶比表面积差异

很大，再加上键合上的配基亦有单层和多层之分，故单标明重量百分含量并不能精确地描述其表面配基的浓度。较好的描述方式是给出其单位表面积的配基浓度。对于单分子层键合相，可以以元素分析测得其含碳量或C. H. O含量计算出每平方米上键合配基的浓度。例如，商业销售的反相介质材料，其配基浓度约2.5～3.0μmol/m^2。对于多层键合相虽也有计算方法，但只要在给出含碳量的同时标明基质硅胶的比表面积，便也可以互相比较了。对聚合物涂层的硅胶，则可以从涂敷量及比表面积计算出涂层的厚度。

键合反相上的残余硅羟基浓度，可以用同位素交换法[55]、也可用$LiAlH_4$法测定[7]。其实，对于大多数硅胶基质反相介质，其配基浓度与残余硅羟基浓度之和应为一恒定值，即8μmol/m^2左右[61]，因此亦可以以残余硅羟基浓度来推知配基浓度，反之亦然。

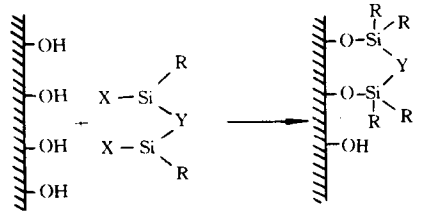
是否配基密度愈高愈好呢？不同学者研究的结果表明，当配基键合密度达到3.1μmol/m^2左右时为最佳值[56]。在分离生物高分子时也发现，烷基密度过高反而会导致回收率下降。

2. 键合相结构与色谱性能的关系

键合相的微观形态及结构与其色谱分离性能有直接的关系，因此人们试图用各种可能的方法对其进行研究。微观形态研究可以使用光学显微镜、扫描电镜、透射电镜等。而结构研究方面曾遇到一些困难，因为它是多孔固体基质上键合了仅有纳米级的配基而形成的复合物。以前尚无直接的测定方法，近年来，随着付立叶转换红外光谱技术(FTIR)和固体核磁技术的发展，给键合相的研究带来了很大的方便。

尽管早在60年代，红外分光光谱技术即已用于研究硅胶及其键合相[57]，但直到80年代，由于付立叶转换红外技术大大提高了测定的信噪比之后，才真正使之实用化[58]。例如，利用漫反射FTIR研究了反相介质在三氟乙酸溶液中的降解后发现，仅一天即开始部份降解，随时间延长将会进一步失去其键合配基[59]。

固体核磁共振波谱(Solid－state NMR Spectroscopy)是研究化学键合硅胶的有力工具，特别是由于魔角探头和交叉极化技术的采用，人们可以测定固体样品，如化学键合相的^1H、^{13}C和^{29}Si核磁共振谱，它们可以分别给出有关元素的精确的结构信息[60]。利用这些技术，已经得到了一些有意义的结果。例如通过对单官能团、二官能团、三官能团氯硅烷键合产物的固体核磁研究，确定了配基在硅胶表面的连接情况[61]。结构研究可以指导合成性能更好的色谱填料。J. J. Kirkland[62]等利用^{13}C-魔角探头固体核磁等技术，详细研究了不同类型的化学键合反相固定相在含三氟乙酸(TFA)的低pH值介质中的稳定性，发展出了两种类型新的反相固定相。一种是利用新型双官能团硅烷化试剂，其中含2个以—O—或$-(CH_2)_n-$桥连接起来的硅原子，而每个硅原子上只有一个反应性基团，它们可以与表面硅羟基形成稳定的结合：



式中X为—Cl、$-OC_2H_5$等；Y为桥链；R为烷基。第二种类型所使用的单官能团硅烷化试剂中，其烷基为(3－氰基异丙基)二异丙基、三异丙基或三叔丁基等，藉以形成具有立体保护效应

的键合相。这两种新型的固定相均具有优良的低 pH 值稳定性和良好的重复性。特别是后一类型的，如其烷基为 3-氰基代异丙基二异丙基时，有优异的稳定性，经以 6000 倍柱体积的 0.1%TFA 淋洗后，其含碳率不降低（图 11-3），以标准蛋白为样品，表现了极好的重复性。

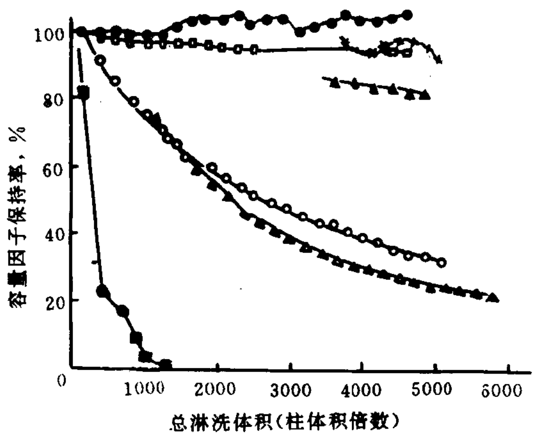


图 11-3 不同种类固定相在 0.1%TFA 淋洗后的稳定性

●：$>$Si—（*i*-Pr$)_2$PrCN；×：$>$Si—（*i*-Pr$)_3$；

□：—Si(Me$)_2C_{18}$；▲：—Si(Me$)_2C_8$；

○：—Si(Me$)_2$PrCN；△：—Si(Me$)_2$-*i*-Pr；

■：—Si(Me$)_2$Me

三、常见的反相介质

目前，市场上的反相介质（包括其预装填色谱柱）牌号、品种多而杂，可以从不同的角度将它们加以分类，例如：

- 反相介质
  - 高分子微球
  - 硅胶（含 CPG）
    - 按粒度分为
      - 分析型：3μm，5μm，7μm，10μm
      - 制备型：>15μm
    - 按孔径分为
      - 小孔：6～15nm，分离小分子物质及分子量 20kD 以下多肽及蛋白质等
      - 大孔：>25nm，分离生物高分子
    - 按形状分为
      - 球形：流体动力学性能好，压降小
      - 无定形：流体动力学性能差，压降大
    - 按孔结构分为
      - 全多孔
      - 表面多孔
      - 无孔
    - 按表面化学结构分为
      - 化学键合相
        - 单层（刷形）
        - 多层
      - 聚合物涂层
    - 按配基种类分为 C_1、C_4、C_8、C_{18}、苯基以及其它

对于生物高分子（例如生物工程产物）的分离，特别是对多肽药物的纯化分离，需要尽可能高的分离效率，因此应尽可能选用球形、全多孔且孔径 25nm 以上的硅胶键合相。单层键合相利于传质但稳定性稍差，而多层键合相传质虽稍差但稳定性好。对分子量较小者，可选用 C_{18} 或 ODS 型配基，而分子量大者以配基链较短者为宜（如 C_8），但链短者稳定性比链长者稍逊。结合无机和有机基质优点的聚合物涂层型有着更广的耐用 pH 值范围，这对生物高分子的分离是极其有利的因素，不过聚合物涂层型无论从制造还是从使用方面尚不如键合相成熟。好的分离流程的最佳化，决不是只选择固定相就能解决的，需要对这一分离体系各种因素的性质及相互关系有深入了解。关于这方面的问题请参阅其它章节。表 11-4 给出了常见的一些反相介质。

表 11－4 常见的反相固定相

名 称	配 基	粒 径,μm	孔径,nm	供应公司或厂家
Amicon C_8	辛 基	5,10,15,20	6,10	Amicon
		20～45,35～70	25	
Amicon C_{18}	十八烷基	20～45,35～70	6	Amicon
Ultrasphere C_3	丙 基	5	/	Beckman
Ultrasphere C_8	辛 基	5	/	Beckman
Ultrasphere C_{18}	十八烷基	5	/	Beckman
Hi－Pore RP－304	C_{18}或C_4	5	30	Bio－Rad
Bio－Sil ODS	C_{18}	5,10	8	Bio－Rad
Zorbax ODS	C_{18}	5,7	7～8	Du Pont
Zorbax Phenyl	苯 基	3,5,7	7～8	Du Pont
Zorbax TMS	甲 基	3,5,7	7～8	Du Pont
Zorbax C_8	辛 基	5	7～8	
Zorbax Bio Series	辛 基	10	15	Du Pont
PEP. RP－1				
Protein PLUS		/	30	
HP－12	可以是丙基-丁基	5,10,15,20	6	HP Chemicals
HP－22	辛基十八烷基	5,10,15,20	15	
HP－32	烷基苯基等	5,10,15,20	25	
Nucleosil800 C_{18}	C_{18}	5,7,10	30	Macherey Nagel
Nucleosil500 C_4	丁 基	7	50	Macherey Nagel
500 C_8	辛 基	7	50	Macherey Nagel
500 C_{18}	C_{18}	7	50	Macherey Nagel
1000 C_4	丁 基	7	100	Macherey Nagel
4000 C_4	丁 基	7	400	Macherey Nagel
4000 C_{18}	C_{18}	7	400	Macherey Nagel
Necleosil C_8	辛 基	5,7,10	10	Macherey Nagel
C_{18}	C_{18}	3,5,7,10,30	10	Macherey Nagel
Lichrospher RP8	辛基二甲基	5,10	10	E. Merck
100RP18	C_{18}二甲基	5,10	10	E. Merck
500RP8	辛基二甲基	10	50	E. Merck
1000RP8	辛基二甲基	10	100	E. Merck
4000RP8	辛基二甲基	10	400	E. Merck
μ-Bondapak C_{18}	正十八烷基	10	12.5	Waters(Millipone)
μ-Bondapak Phenyl	苯 基	10	12.5	Waters(Millipone)
Pep RPC HR5	C_{18}/C_2	5	10	Pharmacia/LKB
Pro RPC HR5/2	C_{18}/C_2	5	30	Pharmacia/LKB
Vydac 201 HSB	C_{18}	5,10,15～20,20～30	8	Separation Groups
Vydac 201 TPB	C_{18}	5,10,15～20,20～30	30	Separation Groups
Vydac 214 TPB	丁 基	5,10,15～20,20～30	30	Separation Groups
Vydac 218 TPB	C_{18}	5,10,15～20,20～30	30	Separation Groups
TSK gel ODS－80T	C_{18}	5	8	TOSOH(东曹)
－120T	C_{18}	5	12	TOSOH(东曹)
－120A	C_{18},封头	5	12	TOSOH(东曹)
300A ODS	C_{18}	5	30	YMC
300A Butyl	丁 基	5	30	YMC

第四节　高效亲水凝胶介质

一、对高效亲水凝胶介质的要求

近代凝胶色谱始于1959年[63]。早期用于凝胶色谱的填料均是天然或合成高分子，它们的机械强度低，很难达到高速、高分辨率，因而无机介质即进入了这一领域[64]。

一种理想的凝胶色谱介质应具备以下性能[G2]：

(1) 机械强度高，能耐受几兆帕的操作压力；

(2) 球形颗粒，粒子直径控制在3～10μm，且粒径分布窄；

(3) 具有亲水性表面；

(4) 非离子性；

(5) 孔径应为5～100nm或更高，孔径分布符合需要；

(6) 具有高孔容；

(7) 至少在pH值3～10之间化学性质要稳定；

(8) 不会引起生物活性物质的失活及降解；

(9) 容易处理和充填；

(10) 价格不贵。

这种理想的介质目前虽然尚未找到，但我们可以研制出基本满足或接近上述要求的材料。

作为凝胶色谱的填料，其粒度及粒度分布、孔径或孔径分布以及孔容是基本参数。粒径及粒径分布影响其柱效。例如，通常所使用的直径50μm的软胶，能达到理论塔板数1500/m左右的柱效，而直径10μm的高效凝胶色谱柱却可以达到理论塔板数15000～20000/m。理论塔板数愈多，则可以分离的组份的数目愈多。

Giddings[65]提出了一个估算理论塔板数 N 与可分离组份数 n 的公式：

$$n=1+0.2\sqrt{N}$$

由式可知，对于一根15000/m的凝胶柱，若其长度为60cm，则 $n\sim20$。孔容是另一项极重要的参数，它关系到凝胶色谱柱的分离容量。根据凝胶色谱的一般理论，柱子总体积 V_T 为：

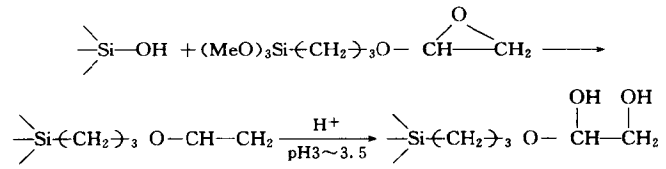
$$V_T=V_o+V_i+V_g$$

式中 V_o 为颗粒间的空间；V_g 为材料的骨架体积；V_i 是凝胶的内孔体积。V_i/V_o 代表了凝胶的分离容量，孔容愈大，V_i/V_o 值就愈高。因此，用作凝胶分离介质的硅胶，必须具有较高的孔容。

二、表面亲水层的键合

未经化学键合或改性的可控孔径硅胶或可控孔径玻璃可以直接用于中性糖的寡聚物和聚合物的分离，但充作生物高分子的亲水凝胶介质必须进行表面亲水处理。

尽管曾有人尝试过其它类型的亲水凝胶，但应用最广的还是二醇型化学键合硅胶[36]：



这一类型的凝胶色谱填料被数家公司商业化并已获得了广泛应用。

三、常见的无机亲水凝胶介质

表 11－5 列出了常见的无机型亲水凝胶，尽管牌号各异，但其化学本质几乎均是二醇型化学键合硅胶。其中，TSK－Gel－SW 型凝胶介质的键合相始终秘而不宣，但据许多实验室的研究，它极可能也是这一类的。

表 11－5 常见的无机基质亲水凝胶介质

商品名称	键合相	粒径 μm	孔径 nm	孔容 ml/g	比表面积 m^2/g	排除极限 蛋白	排除极限 葡聚糖	排除极限 聚苯乙烯	供应厂家或公司
Aquapore－OH	二醇相（甘油基）	10	10	1.7	350	1×10^5	9×10^4		Beownleelabs
			30	2.2	100	1×10^5	8×10^5		
			50			—	2×10^5		
			100			—	2×10^7		
			400			—	—		
Lichrospher Diol	二醇	10	10	1.2	250			8×10^4	E. Merck
			30	2.0	250			3×10^5	
			50	0.8	50			6×10^5	
			100	0.8	20			1.4×10^5	
			400	0.8	6			8×10^5	
Protein Columns 160	二醇	10	6	0.4	190	2×10^4			Waters Millipore
1125			12.5	0.96	320	8×10^4			
1250			25	0.98	130	5×10^5			
SyChropack GPC	二醇	10	10	0.97	250	5×10^5	10^5	8×10^4	SynChrm Inc
			30	1.48	—	—	10^6	3×10^5	
			50	0.91	50	5×10^5	3×10^5	6×10^5	
			100	0.8	20	2×10^7	3×10^7	1.4×10^6	
			400	—	8	—		3×10^6	
TSK－G2000SW	表面羟基	10	13	0.8～1.0	—	1×10^5			TOSOH（东曹）
－G3000SW		10	24	1.5～2.0	—	5×10^5			
－G4000SW		13	45	2.4～2.8		7×10^5			

第五节 高效离子交换色谱介质

在复杂生物体系的分离过程中，离子交换色谱是必不可少的分离模式。作为离子交换色谱填料，可以按其基质的成份和结构大致分成有机和无机基质两大类，两类基质的优缺点已如前述。但 SiO_2 耐受 pH 值范围小（pH2～8）的问题将更加突出。从长远看以高分子为基质的介质以及硅胶-高分子复合型的介质，应具有更好的发展前景。

按照表面基团的不同，可以将离子交换介质分成阴、阳两类，其中又有强、中、弱之分。常见的主要是：

强阴型 (SAX)，如$-N(CH_3)_3^+$ (QAE)

中阴型 (MAX)，如$-O-CH_2-N(C_2H_5)_2$ (DEAE)

强阳型 (SCX)，如$-SO_3^-H^+$ (SA)

弱阳型 (WCX)，如$-OCH_2COOH$ (CM)

一、薄壳型离子交换介质

薄壳型离子交换介质(Pellicular Ion Exchangers)是最早应用于 HPLC 的无机基质交换介质。它是在一个硬质无机内核的表面涂敷或粘上一层有机聚合物层，再经化学衍生而成为离子交换介质。

例如，首先应用的强阴离子交换介质[66]是在实心玻璃微球(30～50μm)涂敷薄层聚苯乙烯-二乙烯苯，经氯甲基化后再季胺化。硅微球亦可应用于这一方法，利用不同的化学反应衍生或修饰后，成为各种不同类型的薄壳离子交换介质。它们机械强度好，因其表面层很薄而利于传质，但是总交换容量相对较低。常见的表面薄壳型离子交换介质列于表 11－6 中。

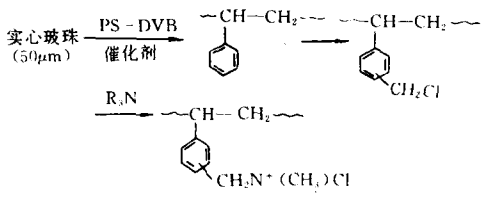


表 11－6 常见薄壳型离子交换介质

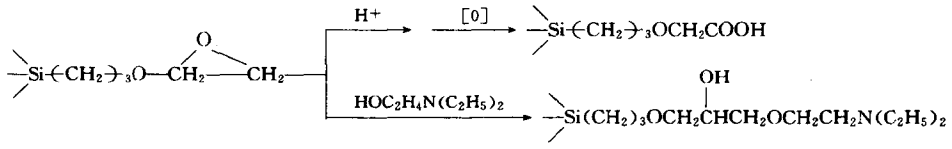
商品名称	类型	聚合物涂层	交换基团	粒径 μm	交换容量 μg 当量/g	厂家或公司
AE－Pellionex SAX	SAX	PS－AE	$-N^+R_3$	44～53	10	Alltech Assoc
AS－Pellionex SAX	SAX	PS－DVB	$-N^+R_3$	44～53	10	Alltech Assoc
Bonda Pak AX/Cor	SAX	BP	$-N^+Me_3$	37～50	10～15	Waters
Vydac SAX	SAX	PS－DVB	$-N^+Me_3$	30～44	100	Separation Group(Vydac)
Zilpax SAX	SAX	LA－ME	$-N^+R_3$	25～37	12	Du Pont
Bonda Pak CX/Cor	SCX	BP	$-SO_3^-$	35～50	30～40	Waters
HC－Pellionex SCX	SCX	PS－DVB	$-SO_3^-$	37～53	60	Alltech Assoc
Vydac SC cation	SCX	PS－DVB	$-SO_3^-$	30～40	100	Separation Group(Vydac)
Zipax SCX	SCX	FC	$-SO_3^-$	25～37	5	Du Pont

BP：键合相； PS－DVB：苯乙烯-二乙烯苯共聚物； FC：氟塑料； PS－AE：苯乙烯脂肪族酯共聚物。

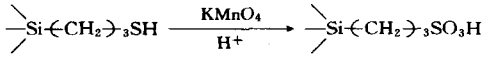
二、全多孔硅胶型离子交换介质

硅胶可以通过不同的表面修饰或再进一步进行衍生反应，生成不同类型的离子交换介质。对基质的要求应考虑到所分离生物大分子的分子量范围，采用大孔硅胶，且应具有足够大的表面积。

表面修饰可以使用前边介绍过的任何修饰方法，最常见的还是通过烷氧基硅烷的方式[36]。例如先在硅胶表面引入环氧基，然后再转化为所需的功能基，生成CM型及DEAE型离子交换介质：



也可以先引入巯基，然后衍生[67]：



这样，便生成了磺酸型强阳离子交换介质。

在离子交换介质的制备中，聚合物涂层法也有重要的应用[68]。先在硅胶上引入乙烯基，再令其与苯乙烯共聚，随后通过衍生反应在苯环上引入各种基团，例如—SO_3H、—$CH_2N^+R_3X^-$，也可以引入其它弱阴、弱阳基团。Gupta 等人(1983)[69]介绍了另一种制备聚合物涂层的方法：通过硅胶的表面修饰使其带上适当的反应基团，将其上涂以聚乙烯亚胺(Polyethylenimine PEI)并使其与硅胶上的反应基团作用，便生成了键合相。Pharmacia 公司的 Plyanion SI 即属此类，它用作 HPLC 系统的介质，填装成预装柱销售。此外，聚琥珀酸亚胺可以在 β-氨基丙酸催化下与带有氨基的硅烷反应，通过这一反应，可以制备出复合型硅胶-聚酰亚胺型阳离子交换介质，它非常适于蛋白质类的分离。通过进一步修饰，还可以制备出一系列其它用途的产品，用于酶的固定化或亲和载体。

还有人报导，在无机基体表面通过吸附一层有机层的方法制备离子交换介质，例如，将 DEAE-葡聚糖吸附于或交联于硅胶表面，亦可用于生化分离。

一些常见的、用于生物高分子分离的离子交换介质举例如表 11-7 所示。

表 11-7　用于生物高分子分离的离子交换介质

商品名称	用　途	交换基团	粒径 μm	孔径 nm	交换容量 μmol/g	公司与厂家
Anion SW	离子色谱	$-NR_3^-$	5	17.5	400	Bio Rad
Zorbox Bio	通　用	$-N^+(CH_3)_3$	7	30	/	Du Pont
Series SAX,WAX	核苷酸	$-NH_2$	7	30	/	Du Pont
Nucleo sil SB	通　用	$-N^+(CH_3)_3$	5,10	10	1000	Macherey-Nagel
Lichruspher SAX	通　用	$-(CH_2)_xN^+R_3$	5,10	18	/	E. Merck
Poly Methyl A	多肽,蛋白,HIC	Polypeptides	5,7,15～20	30,200	/	Poly LC
Poly Ethyl A	多肽,蛋白,HIC	Polypeptides	5,7,15～20	30,100	/	Poly LC
Polypropyl A	多肽,蛋白,HIC	Polypeptides	5,7,15～20	30,100	/	Poly LC
Poly Butyl A	多肽,蛋白,HIC	Polypeptides	5,7,15～20	30,100	/	Poly LC
SynChropak 300	蛋白质	$-N^+R_3$	0.5	30		SynChrom
SynChropak AX100	蛋白质	$-NR_2$	5,6.5,55	10		SynChrom

（续表）

商品名称	用　途	交换基团	粒径 μm	孔径 nm	交换容量 μmol/g	公司与厂家
AX1000	蛋白质	$-NEt_2$	5,6.5,55	100		
TSK-Gel DEAD-2SW	生化用	$-NEt_2$	5	12.5	>300	Toyo Soda
TSK-Gel DEAE-2SW	生化用	$-NEt_2$	10	15	>300	
Zorbax Bio	有机碱	$-SO_3^-$	7	30	/	Du Pont
Series SCX,WCX	多肽	—COOH	7	30	/	Du Pont
Nucleosil-SA	通用	$-SO_3^-$	5,10	10	1000	Macherey-Nagel
Poly CATA	蛋白	聚门冬氨酸	5,7,15～20	30,10	/	Poly LC
SynChropak S300	蛋白质	$-SO_3^-$	6.5	30	/	SynChrom
SynChropak CW300	蛋白质	—COOH	6.5	30	/	SynChrom
TSK-Gel CM-2SW	生化分离	—COOH	5	12.5	>300	Toyo Soda
TSK-Gel CM-3SW	生化分离	—COOH	10	25	>300	Toyo Soda

第六节　高效亲和色谱介质

亲和色谱以其极高的选择性不可代替地应用在复杂生物体系的分离、分析中。常规的亲和色谱，使用的多是天然或合成高分子载体，而天然高分子（糖凝胶、琼脂糖凝胶等）多数机械强度差，难以提高淋洗速度，其与配基的键合多数通过表面羟基进行，结合并不十分牢固，加以还有滋生微生物的危险，故其更广泛的应用受到了限制。

与其相比，无机基质（如可控孔径硅胶、可控孔径玻璃等）因为机械强度高且可通过各种化学键合而增加配基牢度，同时，也不利于微生物的生长，因而近年来以 CPS 或 GPG 为基质的高效亲和色谱逐渐引起人们的重视并展现了很好的应用前景（表 11-8）[84]。

表 11-8　高效亲和色谱应用举例

配　基	与其相互作用的生物分子
抗体	
抗胰岛素（单克隆抗体）	胰岛素
抗白细胞 A 干扰素（单克隆抗体）	α-干扰素
抗原	
苯并二氮䓬	抗苯并二氮䓬
核苷酸	
AMD	醇脱氢酶
NAD	乳酸脱氢酶

（续表）

配　基	与其相互作用的生物分子
蛋白质	
大豆胰蛋白酶抑制剂	胰蛋白酶，胰凝乳蛋白酶
蛋白质 A	免疫球蛋白，免疫络合物
蛋白质 G	单克隆抗体
伴刀豆球蛋白 A	糖类，糖蛋白类
外源凝集素	膜蛋白，寡糖
牛血清白蛋白	对映体
其它	
硼酸	核酸成份，核苷糖类
蓝染料 F3G－A	脱氢酶、激酶、核糖核酸酶
头孢菌素	β-内酰胺酶
氨基糖	伴刀豆球蛋白 A
亚氨基二乙酸(IDA)	金属结合蛋白，氨基酸
氨基苯甲脒(ABA)	血纤维蛋白溶酶
	血纤维蛋白溶酶原
糖类	外源凝集素
吩噻嗪	调钙蛋白

一、高效亲和色谱的特点

高效亲和色谱(HPAC；High Performance Affinity Chromatography)兼具亲和色谱和高效液相色谱的特点。高机械强度使得 HPAC 可以以很高的速度淋洗并承受由此带来的较高的工作压力。高效亲和色谱一般可在几分钟至几十分钟内完成，相对于常规软胶亲和色谱的几小时至几十小时，不仅可以提高效率，还可以改善回收产物的纯度和浓度；淋洗速度快使得色谱峰非常尖锐，这大大提高了信噪比而使检测灵敏度得以大幅度提高。高度的亲和力使得 HPAC 在所有色谱方法中具有更高的选择性，正是由于这一特性，使得 HPAC 中的分离效率随填料粒径减少而增加的规律变得不那么重要了，所以有可能使用大粒径的硅胶而仍获得良好的分离。此外，配基结合的牢固性也可以延长填料的寿命并提高产物的质量，这对生物工程的分离、纯化工作是非常有利的。

当然，无机基质也有其弱点，主要是耐受 pH 值范围窄(pH2～8)，并且残余硅羟基可造成非特异吸附而降低收率，甚至导致产品失活。

二、用于高效亲和色谱的基质

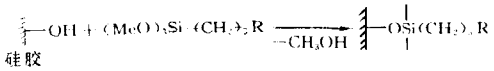
最重要的基质是多孔硅胶。当然，如果解决了生产价格问题，CPG 以其孔径分布窄及孔径易于控制的特点，也是优良的基质。因它们的化学本质是一样的，故不再单独加以讨论。硅胶的孔径以 30～100nm 为宜。过小，会产生凝胶渗透或体积排除效应，而过大时又势必会因比表面积的降低而减少样品负载量。过大的孔容会损坏机械强度，故而有中等孔度即已足敷应用。由于亲和色谱高选择性的特点，使得过细的颗粒度并不是很必要的，因此，在 HPAC 中可使用

5～50μm 左右的粒度[79]。最近，直径小至 0.7～2.1μm 的无孔或“非渗透性”的小直径硅胶也应用到了 HPAC 上[80]，进一步提高了分离速度。更有人将超细石英纤维(0.5μm 直径，50μm 长)用作为亲和介质的基质，通过涂于纤维表面的活化的葡聚糖与 DNA 的衍生物键合，用以分离牛心乳酸脱氢酶。这种纤维状的介质由于通透性好，可以使用很高的淋洗速度，且因纤维直径仅 0.5μm，比表面相对较大，每克纤维可以吸附 15mg 酶。装有 100g 纤维的柱子 1h 可以纯化 1g 产物，在制备分离方面有很大应用价值。

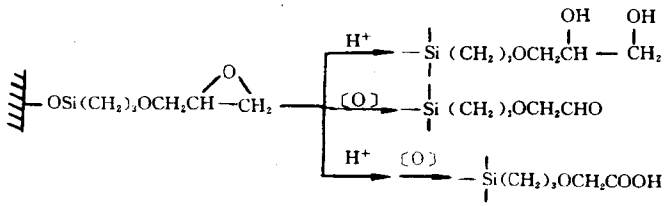
三、硅胶的活化

硅胶的活化应解决 3 个问题。一是提供与配基反应的基团；二是提供适当长短的间隔臂；三是解决残余游离硅羟基带来的非特异性吸附并对硅胶提供保护，以使其工作于更广的 pH 值范围。与其它硅胶的修饰类似，这里可用表面修饰和聚合物涂层两种方法。

由于亲和色谱中不需要很高的配基浓度，故在表面装饰时主要利用烷氧基硅烷化在水相中与硅胶反应，以形成可供进一步衍生反应的基团：

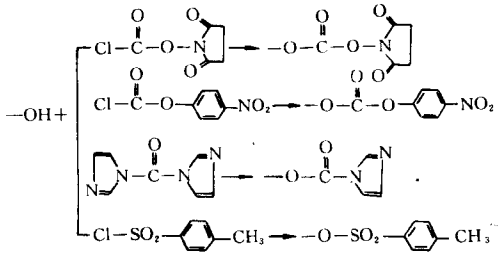


当 R 为环氧基时还可进一步转化为其它基团，如：



当 R 为—SH、—NH_2 等基团时，也可以以类似的反应形成不同活化形式的基团。

这里生成的—OH、—$CHCH_2OH$（OH）、—CHO、—COOH、—NH_2、—SH 等均可进一步反应。例如，羟基又可进行一系列类似软胶中应用的活化方法[81]：



环氧基与蛋白质上的氨基虽可以直接反应，但反应速度很慢。如让它与一系列其它试剂反应，则可以有很大的灵活性，图 11－4 中示意地给出了环氧硅胶的各种键合反应途径[82]。作者曾对比了这 3 种方法，以大豆胰蛋白酶抑制剂为配基分离胰蛋白酶，确认以醛基硅胶效果最好。由于采用 5μm 硅胶为基质，所得色谱峰非常尖锐，因而检测灵敏度亦随之提高。在 280nm 检测时，胰蛋白酶最低检测量达 1ng，并且酶的活性回收率也提高了。

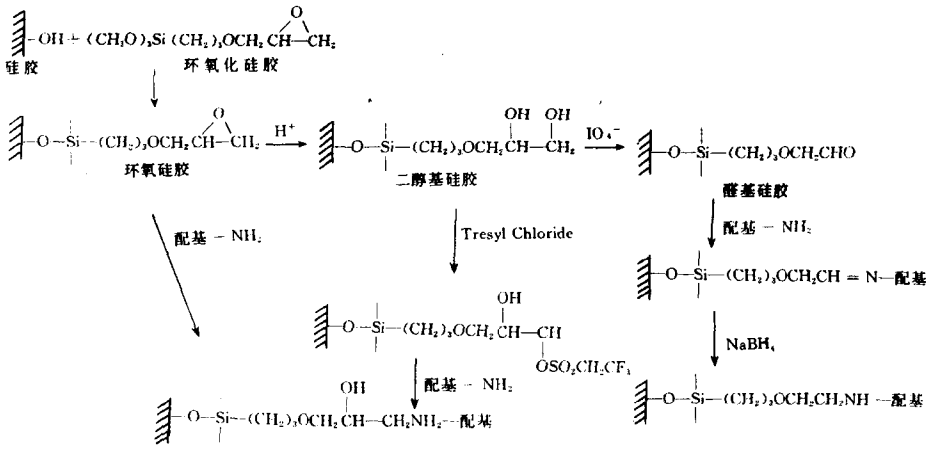


图 11-4　配基与环氧化硅胶偶联的途径

早期使用的环氧化硅胶，键合效率很低。现已发展出一种商品化的新型聚合物包覆型环氧化硅胶，它的基质为直径 37～55μm、孔径 50nm 的硅胶，聚合物涂层系亲水型的，可以避免蛋白质的非特异性吸附，而表面稳定的环氧基则可以与各种配基键合[83]。这也表明了一种趋势，即已活化好的预装柱将会更快地走向市场。

亲水性聚合物涂层看来更适合于 HPAC 的要求。以 DEAE -衍生的葡聚糖或琼脂糖涂层的硅胶有良好的应用前景。

在硅胶活化的过程中，间隔臂长短并未引起太大的问题，因为这些硅烷化试剂本身已带有足够长的分子链，无须专门去考虑。

四、一些商品化的高效亲合介质

表 11-9 列出了一些商品化的 HPAC 介质，除少数为高聚物外，大多为硅胶基质[84]。

表 11-9　市售高效亲和介质载体

类　型	商品名	基　质	粒径，μm	主要用途	供应公司或厂家
活化凝胶					
醛基		硅胶	10，30	偶联氨基	SE，ST，C
氯甲酸脂	HyPAC Carbonite N	硅胶	5～10	偶联氨基	BA
环氧	Ultraffinity - EP	硅胶	10	偶联氨基	B
	Eupergit	丙烯酸酯	30	偶联氨基	R
	Durasphere A	硅胶	7	偶联氨基	A
羟基丁二酸	Affiprep 10	聚合物	40～60	偶联氨基	BR
Tresyl	SelectiSpher Tresyl	硅胶	10	偶联巯基	PR，P
	Shim - Pack AFC - TR	硅胶	10	偶联巯基	S
	TSK Gel Tresyl - 5PW	苯乙烯-二乙烯苯共聚物	10	偶联巯基	TS

（续表）

类　型	商品名	基　质	粒径，μm	主要用途	供应公司或厂家
	YMC－Pack	硅胶	10	偶联巯基	Y
	AFS－Tresyl				
清蛋白	Resolvosil	硅胶	10	对映体分离	MN
硼酸盐	Selecti Spher				
	Boronate	硅胶	10		PB
	TSK Gel Boronate－5PW	苯乙烯-二乙	10		TS
		烯苯共聚物			
	Shim－Pack AFC－BN	硅胶	10		S
	YMC－Pack	硅胶	10		Y
	AFS－Boronate				
蓝染料	SelectiSpaer	硅胶	10		PB
	Cibacron Bule				
	Shodex AF－PAK	聚合物	15～20		SD
	TSK Gel Bule－5PW	苯乙烯-二乙	10		TS
		烯苯共聚物			
	Durasphere	硅胶	7		A
	Shim－Pack AFC－CB	硅胶	10		S
伴刀豆球蛋白 A	SelectiSpher Con A	硅胶	10		PB
	Shodex AF－PAK	聚合物	15～20		SD
	Durasphere Con A	硅胶	7		A
	Shim－Pack AFC－CA	硅胶	10		S
亚氨基二乙酸	Immunodiacetic acid	硅胶	10		SE
	Si 100				
	Shodex AF－PAK	硅胶	15～20		SD
血清类粘蛋白	LKB－Enantiopac	硅胶	10		PHL
蛋白质 A	SelectiSpher Protein A				
	Durasphere	硅胶	10		PB,P
	Protein A	硅胶	7		A
	Shim－Pack AFC－PRA	硅胶	10		S
	Shodex AF－PAK	聚合物	15～20		SD
	Protein A Soperose	琼脂糖	10		PHL
	HiPac Protein A	硅胶	30		C
	PL－AFC Protein A	聚合物	10～25		PL
	AffiPrep Prot A	聚合物	40～60		BR
蛋白质 G	SelectiSpher Protein G	硅胶	10		PB
	Shim－Pack AFC－PRG	硅胶	10		S

（续表）

类　型	商品名	基　质	粒径，μm	主要用途	供应公司或厂家
	Gammabind HPLC	硅胶	30		G
	YMC－Pack	硅胶	10		Y
	AFS－Protein G				

供应公司或厂家：A－Alltech；B－Beckman；BA－Barspec；BR－Biorad；C－Chromatochem；G－Genex；MN－Nachery－Nagel；P－Pierce；PB－Perstorp Biolytica AB；PHL－Pharmacia－LKB；PL－Polymer Lab；R－Rhom－Pharma；S－Shimadzu；SE－Serva；SD－Showa Denko；ST－Sterogen；TS－Toso Haas；Y－YMC。

第七节　高效疏水作用介质

利用蛋白质与固定相之间的弱疏水相互作用的疏水作用色谱，特别适用于蛋白质类生物工程产品的分离。

疏水作用色谱（HIC；Hydrophobic Interaction Chromatography）始于1972年[71] Shaltiel S. 及其工作者，他们利用带有碳氢化合物配基的琼脂糖凝胶以“疏水亲和色谱”分离蛋白质。在其它实验室内也进行了类似研究和探索，1976年 Hofstee B. H. J. 将这种类型的色谱命名为疏水作用色谱。1980年前后，不少学者就疏水作用的机理、分离规律等进行了大量研究，但这些工作多是用软或半硬基质进行的，其基本形式是将短烷基链键合于亲水性基球上，作为配基的烷基链的密度通常不大，且操作压力和流速均不能提高。为改善HIC的分离效率和分离速度，出现了以硬质高聚物微球、硅胶以及CPG为基质的高效HIC固定相[72～77]。

与其它类型相比，对用于这种介质的硅胶基质并没有特殊的要求，只要孔径在25～100nm之间且有较大的比表面积就可以应用，与对CPG的要求相似。只要经过表面修饰或涂层，使其具有合适的亲水表面和较弱的疏水基，就可以制备出高效疏水作用色谱。

尽管曾研究过不同类型的高效疏水作用固定相，但有实用价值的主要是两类。一类是在基质表面键合上短链烷基或苯基而成[78]，例如 Phenyl－TSK－Gel 3000 SW 柱即是一种性能优良的商品 HPHIC 柱。另一类是醚型键合相[75,78]。在硅胶上先键合上环氧丙氧基三乙氧基硅烷，再在路易士酸催化下接上短链烷氧基而成。

$$\equiv Si\text{-}(CH_2)_3O\text{-}(CH_2\text{—}CH_2\text{—}O)_n R$$

如果将聚乙二醇与环氧化硅胶反应，则可制备出聚乙二醇型HIC介质，我国有几家单位曾对此进行过深入研究并取得了很好的结果。

综合参考文献

(G1) K. K. Unger (ed.), Packings and Stationary Phases in Chromatographic techniques, New York and Basel, Marcel Dekker, Inc., 1990

(G2) O. Mikes, High Performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Biooligomers, Part A. Elsevier. 1988

(G3) P. L. Dubin (ed.), Aqueous Size－Exclusion Chromatogr., 1988

参考文献

1 H. P. Boehm and H. Knoezinger, Catalysis, Vol. 4, Berlin, Springer－Verlag, 1983,40～189

2 J. J. Fripiat and J. Uytterhoeven, J. Phys. Chem., 1962, 66, 800

3 K. K. Unger, Porous Silica, Amslerdam, Elservier, 1979

4 K. K. Unger, Kolloid—Z., Z. Polymere, 1970, 237,350

5 L. T. Zhuravelev., Kolloidnyi Zh., 1962, 24, 22

6 H. Hemeisberger, et al., Chromatographia, 1976, 7, 303

7 中国科学院化学所内部报告

8 J. Nawrocki, et al., Chromatographia, 1989, 28, 143

9 K. K. Unger edited, Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques, New York and Basel, Marcel Dekker, Inc., 1990

10 S. J. Gregg and K. S. W. Sing, Adsorption, Surface Area and Porosity, London, Academic Press, 1967

11 K. K. Unger, et al., J. Chromatogr., 1973,83, 5～9

12 J. J. Kirkland, U.S. Patent 3782075,,1974

13 R. K. Iler, H. J. McQueston, U.S. Patent 3855172, 1974

14 柴志宽等,高分子通讯,1989,No. 3, 134

15 中国科学院化学所内部报告

16 K. F. Krebs and H. Heinz, Ger. Pat. No. 2042910, 1970

17 柴志宽等,化学通报,1978,5,20～23

18 吉林化工院物化室,分析化学,1976,4,363

19 Fr. Patent 1473240, 1475924, 1967

20 Haller W., Nature, 1965, 206, 693

21 Haller W., in Scoliten WH ed., Solid Phase Biochem., John Wiley and Sons, Inc., 1983, P535

22 黄熙怀等,硅酸盐学报,1984,12,193～201

24 Engene Sulkowski, Protein Purification: Micro to Macro, Alan R. Liss, Inc., 1987

26 W. K. Kreis and K. K. Unger, Adsorption at the Gas－Solid and Liquid－Solid Interface, Amsterdam, Elsevier, 1982, P373

27 T. Ono, et, al., Preparation of Catalysis 3, Amsterdam, Elsevier, 1983, P631

28 J. J. Pesek and H. D. Lin, Chromatographia, 1989, 28, 565

29 H. Th. Rijnten, Physical and Chemical Aspects of Adsorbents and Catalysis (B. G. Linsen, ed.), London, Academic Press, 1970, P355

30 Sivakoff, J. Chromatogr., 1986, 352, 381

31 Gyula Szabo, et al., Anal. Chem., 1988, 60, 213

32 E. A. U. Ebosworth, in A. G. Macdeamid ed. Oganometallic Compunds of the Group IV Elements, Vol. 1, Part I, New York, Marcel Dekker, 1968, P45

33 W. Noll, Chem. and Techn. of Silicones, London, Academic Press, 1968,P298

34 中国科学院化学所实测数据

35 D. C. Locke, et al., Anal. Chem., 1972, 44, 90

36 Chang, et al., J. Chromatogr., 1976,

37 N. H. C. Cooke, et al., J. Chromatogr., 1978, 149, 391

39 B. B. Wheals, J. Chromatogr., 1975, 107, 402

40 M. P. Rigney, T. P. Weber and P. W. Cara, J. Chromatogr., 1989, 484, 273

41 E. J. Corey, et al., Tetrahedron Lett., 1981, 22, 3455～3458

42 K. Szabo, et al., Hely. Chim. Acta., 1984, 57, 2128～2142

43 王天用等. 中国科学院化学所内部资料

44 K. D. Lork, et al., J. Chromatogr., 1986, 351, 393
45 国家建材总局南京玻璃纤维研究院编. 国内外偶联剂品种汇编. 1978
47 H. Figge, et al., J. Chromatogr., 1986, 351, 393
48 Y. Ohtsu, et al., Chromatographia, 1987, 24, 380～384
49 T. M. Khong and C. F. Simpson, Chromatographia, 1987, 24, 385
50 T. M. Khong and C. F. Simpson, UK Patent 8618322, 1986
51 T. M. Khong and C. F. Simpson, Anal. Proc., 1988, 25, 72
52 S. O. Akapo and C. F. Simpson, J. Chromatogr., 1990, 28, 186
53 Colin T. Mant and R. S. Hodges J. Chromatogr., 1987,. 409, 155
54 P. Helboe, Adv. Chromatogr. (NY), 1989, 28, 195～265
55 H. Holic and B. Matejkova, J. Chromatogr., 1981, 213, 33
56 Sentell, K. B., Anal. Chem., 1989, 61, 930
57 L. H. Little, Infrared Spectra of Adsorbed Specles, London, Academic Press,1966
58 J. R. Ferraro and L. J. Basile (ed.), Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Vols. 1－4, New York, Academic Press, 1978, 1979, 1982, 1985
59 R. A. Hartwick, J. Chromatogr., 1988, 458, 225
60 G. Engelhardt and D. Michel, High Resolution Solid State NMR of Silicates and Zeolites, John Wiley and Sons, Chichesier, 1987
61 E. Bayer, et al., J. Chromatogr., 1983, 264, 197
62 J. J. Kirkland, et al., Anal. Chem., 1989, 61, 2～11
63 J. Porath and P. Flodin, Nature, 1959, 183, 1657
64 A. J. de Vries, et al., Anal. Chem. 1967, 39, 935
65 J. C. Giddings, Anal. Chem., 1967, 39, 1027
66 C. Horvath, et al., Anal. Chem., 1967, 39, 1422
67 B. B. Wheals, J. Chromatogr., 1979, 177, 263
68 M. Cande and R. Rosset, J. Chromatogr. Sci., 1977, 15, 405
69 Gupta, et al., 1983
70 Holik, M., et al., J. Chromatogr., 1981, 316, 33
71 Er－EL, Z. Zaidenzaig, Y., and Shalitiel, S., Biochem. Biophys. Res Commun., 1972, 49, 283
72 Hofstee, B. H. J., J. Macromol. Sci. Chem., 1976, A10, 111
73 Kato. Y., et al., J. Chromatogr., 1983, 266, 49; 1984, 292, 418; 1986, 360, 260
74 Fauusnaugh, J. L., et al., Anal. Biochem., 1984, 137, 464
75 Chang, J. P., el al., J. Chromatogr., 1985, 319, 396
76 Rassi, Z. E. and Norvath, C., J. Liq. Chromatogr., 1986, 9, 3245
77 安建国,张仁斌. 色谱. 1988,6,6
78 N. T. Miller, et al., J. Chromatogr., 1985, 316, 519
79 D. J. Phillips, et al., J. Chromatogr., 1991, 536, 95～106
80 F. B. Anspach, et al., Anal. Biotech. 1989, 179, 171
81 Karin E. C. and Meir. W. J. Chromatogr., 1987., 397, 187
82 K. Mosbach, et al., Anal. Chemistry Series, 1981, 9, 203
83 吴晓军,刘国诠. 生物物理与生物化学学报,1992,24,279
84 S. Ohison, et al., TIBTECH, 1989, 7, 179
85 Hans Jürgen Wirth, M. T. W. Hearn, et al., 12th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides. (Sydney. Australia) 1992, No. 113

第十二章　羟基磷灰石分离介质

余贤真　　周纯益

（中国科学院化工冶金研究所，北京，100080）

羟基磷灰石(Hydroxyapatite，HAP)是一种无机盐，结晶状，属六方晶系，单位晶格常数 $a=0.941$nm，$b=0.688$nm，在自然界也存在，它是牙科、骨科的基本材料之一，与生物体有很好的相容性。

羟基磷灰石用于蛋白质的分离纯化研究首先由 Tiselius 等人[1]于 1956 年报道，随后经历了一个较长时期的很多人的努力，近年来才有长足的进展，使其成为水体系中蛋白质、核酸和病毒色谱分离最强有力的技术之一[2]。本文就羟基磷灰石用于生物大分子的色谱分离纯化的简要情况综述如下。

第一节　发展概况

1956 年，Tiselius 等[1]首次推出羟基磷灰石柱色谱用于蛋白质的分离纯化。

1959 年到 70 年代初期，以 Bernardi[3~5]为首的许多研究者为阐明羟基磷灰石的色谱机理开展了大量的试验工作。

1972 年，Moss 等[6]报告了在去污剂存在下的羟基磷灰石色谱方法。

1973～1974 年，Martinson 等[7,8]揭示了核酸与羟基磷灰石之间的相互作用机理。

1978 年，Spencer[9,10]报告了羟基磷灰石合成方法与其色谱性质之间的关系。

1984 年，Gortunoff 等[11~13]又继续了 Bernardi 实验室的研究。

1983 年，Bio Rad 公司推出了第一支商品化不锈钢 Tiselius 型羟基磷灰石 HPLC（High Performance Liquid Chromatography）柱；其后是 Koken 公司。

稍晚，日本 Mitsui Toatsu Chemicals 推出由羟基磷灰石构成的六角棒聚集体填充的 HPLC 柱。

1986 年，Kawasaki 等人[14]报道了第一支由羟基磷灰石微晶构成的球形（约 5μm 直径）填充的 HPLC 柱。

几乎同时，Kadoya 等人[15]及 Koken、Tonen、Asahi Optical 公司等都报告了球形羟基磷灰石填充的 HPLC 柱；此时约 20μm 大小的球形羟基磷灰石填充的高效液相色谱柱从 Regis 公司也能买到。

1987 年，另外两种类型的球形羟基磷灰石填充的 HPLC 柱由 Tosoh 和 Cica－Merck 公司分别报道；同时 Koken 公司还推出了方砖形羟基磷灰石填充的 HPLC 柱。

1989 年，Sato[17]开发了用 F^- 取代 OH^- 的球形氟基磷灰石，由于 F^- 的取代，使磷灰石使

用的 pH 值范围由碱性或近中性扩展到 pH4.0 左右。

近几年，国内市场上出售的羟基磷灰石基本属于 Tiselius 型，即片状晶体。

在国家高科技计划支持下，国内开展了球形羟基磷灰石的研制并取得进展，现已研制出两种新产品，即复合球形羟基磷灰石和均相法球形羟基磷灰石。

综上所述，羟基磷灰石作为色谱分离介质用于生物分子的分离纯化研究的长足进步，是在 1986 年第一支商品化羟基磷灰石 HPLC 柱问世以后，特别是球形羟基磷灰石的问世。

可以预料：

(1) 随着人们对 HAP 填充介质的注意，一些更有效的制备球形 HAP 的方法必将逐渐完善，机械强度更好的陶瓷 HAP 也将广泛使用。

基于用 F^- 取代 OH^- 使磷灰石的应用 pH 值范围达 pH4，用 Cl^-、CO_3^{2-} 或其它基团取代 OH^-，或许会使磷灰石显示出某些特殊性能。

(2) 随着人们对 HAP 色谱机理定量研究的深入，更准确预见色谱曲线和预先确定分离条件将成为可能。

(3) 为专用于某种分离目的在 HAP 表面进行相应的化学修饰，目前已有报道。有关这方面的研究将会进一步开展。

第二节 HPLC 柱对介质的要求及羟基磷灰石的性能

一、高机械强度

在 HPLC 柱中流动相一般在高压下通过柱，因而要求填充介质具有高的机械强度。现在使用的羟基磷灰石，尤其是球形颗粒可以在 15MPa 压力下使用，通过强化方法制备的羟基磷灰石即所谓陶瓷羟基磷灰石可在几十兆帕以上的压力下使用。

二、粒子大小、形状和孔隙

填充介质的粒子大小、形状以及表面结构与 HPLC 柱的理论塔板数直接相关，通常要求高的理论塔板数；用粒径小而均匀的球体填充的柱，其理论塔板数可达数万以上，而片状只有几百到数千。

采用特定的制备方法，球形羟基磷灰石颗粒表面可具有 10～100nm 的开口孔隙。

球形羟基磷灰石颗粒大小、形状和孔隙可满足 HPLC 柱的要求。

三、化学和热稳定性

色谱过程是在流动相与固定相即填充介质之间频繁强烈接触中完成的，因此要求填充介质在流动相中的溶解度很低。羟基磷灰石在中性或碱性水相中的溶解度很低（溶度积 1×10^{-115}～1×10^{-110}），因此可以用中性或碱性水相淋洗剂，甚至可以用碱溶液淋洗，以再生柱。它不溶解于有机溶剂，可用有机溶剂淋洗，还可用作分配色谱介质。

均相法、喷雾法等方法制备的羟基磷灰石球可在高温下煅烧而不发生相变，因此高温烧结常用来制备所谓陶瓷羟基磷灰石，以增强其机械强度。

四、非可逆性吸附

为有足够高的柱效和选择性，HPLC 柱要求填充介质低非可逆性吸附。羟基磷灰石满足这一要求，它的非可逆性吸附很低。

五、表面化学修饰

为用于高效亲和色谱，要求在填充介质表面配接相应的功能基团。如前所述，羟基磷灰石表面可以进行各种化学修饰。

总之，羟基磷灰石作为色谱柱填充介质能提供专一的选择性，具有高的键合容量、低的非可逆性吸附以及对化学和热的稳定性，完全满足HPLC柱的要求。球形羟基磷灰石的问世，克服了传统羟基磷灰石晶体的易碎性缺点；合成条件与色谱性能之间关系的研究及新的合成方法的出现，克服了羟基磷灰石因制备方法不同而性能有所差异的缺点。羟基磷灰石在色谱法中的应用将日趋完善。

第三节　羟基磷灰石的制备方法

制备羟基磷灰石的方法通常有干法、水热法和湿法3种。用于色谱填充介质的羟基磷灰石的制备主要以湿法为主。

一、Tiselius型羟基磷灰石的制备方法

Tiselius型以及一些与其有关的改进型都是以钙盐或氢氧化钙与碱金属磷酸盐、磷酸铵或磷酸在水溶液中控制反应条件结晶而成，这类羟基磷灰石往往是不规则的片状体。其制备技术路线如图12-1所示。

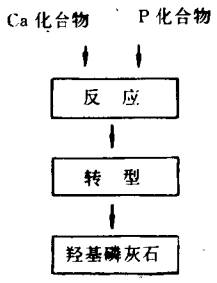


图12-1　制备Tiselius型羟基磷灰石的技术路线

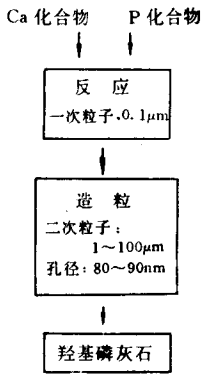


图12-2　日本制备色谱用羟基磷灰石的技术路线

因为Ca^{2+}和PO_4^{3-}在水溶液中可生成多种形式的磷酸钙盐，因此通常需在适当条件下使它们转化成羟基磷灰石。

Tiselius型从1956年开始用于生物分子的色谱法分离至今仍是一些厂家的商品，如Bio Rad公司、Fluka公司、Sigma公司拥有相当多的用户。但由于这种类型的羟基磷灰石晶体不规则且往往呈片状，因而在流动相压力下受到冲击时晶体易于破碎，改变了柱的填充状态，使柱效降低，重复性变差，妨碍它的广泛使用，这也是Tiselius型从1956年问世以来徘徊多年、无显著进展的原因。

针对Tiselius型的缺点曾提出过各种改善途径，如在球形硅胶基质或其它基质上覆盖羟

基磷灰石[18,19,19a,19b,19c]或制成粒状、棒状等，弥补了一些羟基磷灰石晶体易碎性方面的不足。

为克服羟基磷灰石颗粒大小的波动，日本专利 JP86 18868 报道了一种制造均匀 HAP 颗粒的方法。以 $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ 晶体颗粒为先导物质，在高于其脱水温度和相变温度而又不致于发生分解的条件下加热，首先脱水、相变成为 $CaHPO_4$，然后用碱处理转变成晶体 HAP，它的大小较均匀，约 1～3μm 厚，数微米大小。

克服羟基磷灰石片状晶体易碎性的最好办法是由羟基磷灰石微晶聚集成球形颗粒，这种合成方法不但使羟基磷灰石颗粒提高了机械强度，而且大大提高了色谱柱的理论塔板数。

二、日本制备羟基磷灰石的方法

在日本球形羟基磷灰石的制备一般采用两步法，即首先制备羟基磷灰石微晶（微小针棒状体），然后造粒。造粒通常采用喷雾法，即在适当粘结剂存在下，喷雾干燥羟基磷灰石悬浮物成为球粒，合成流程示意图如图 12－2 所示。

也有一次喷雾热解制备羟基磷灰石的，如井上千也等人[20]用硝酸钙和磷酸的甲醇溶液在 800～1400℃之内高温喷雾热解制备球形颗粒。此法制备的羟基磷灰石颗粒的球形度较差，粒径分布较宽。

日本人增加羟基磷灰石抗压强度的办法之一是将二次颗粒在不低于 300℃下加热，在不高于颗粒分解温度下烧结，使一次颗粒紧紧粘在一起，呈现出优异的抗压性能（JP61 49699）。

高温烧结得到的所谓陶瓷羟基磷灰石，是在加入少许配料之后，在 800～1400℃烧结而成的。

三、制备球形羟基磷灰石的新方法

为适应羟基磷灰石当今世界长足进展的形势，中国科学院化工冶金研究所开展了新型羟基磷灰石的研制，发展了两种新的制备方法，得到两种新型球形羟基磷灰石。

1. 球形复合羟基磷灰石[21]

制备流程示意如图 12－3。

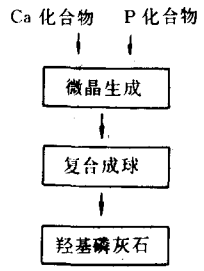


图 12－3　制备复合球形羟基磷灰石的技术路线

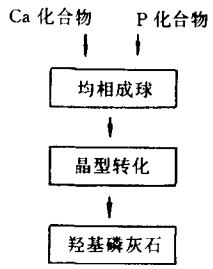


图 12－4　均相法制备球形羟基磷灰石的技术路线

这是以高分子基质和羟基磷灰石微晶在一定条件下反应、复合而成。现可得到～5μm、10～20μm 及＞40μm 各种粒径范围的球体。其色谱性能优于片状羟基磷灰石，用它填充的色谱柱柱压低、流速快。

2. 均相法球形羟基磷灰石[22]

制备流程如图 12－4 所示。

这是在严格控制晶核数目、晶体成长速度的反应条件下得到的球形颗粒，为避免反应过

程中可能生成的其它形式的磷酸钙盐，需采用晶型转化措施。该方法可得到 2～5μm、10～20μm 及 30～60μm 球粒。该法制备的羟基磷灰石球形度好，粒径分布较窄。与日本人的球形羟基磷灰石制备工艺相比，使用设备简单，过程简短。

球形复合 HAP 和均相法球形 HAP 的外貌如图 12－5 和图 12－5a 所示。

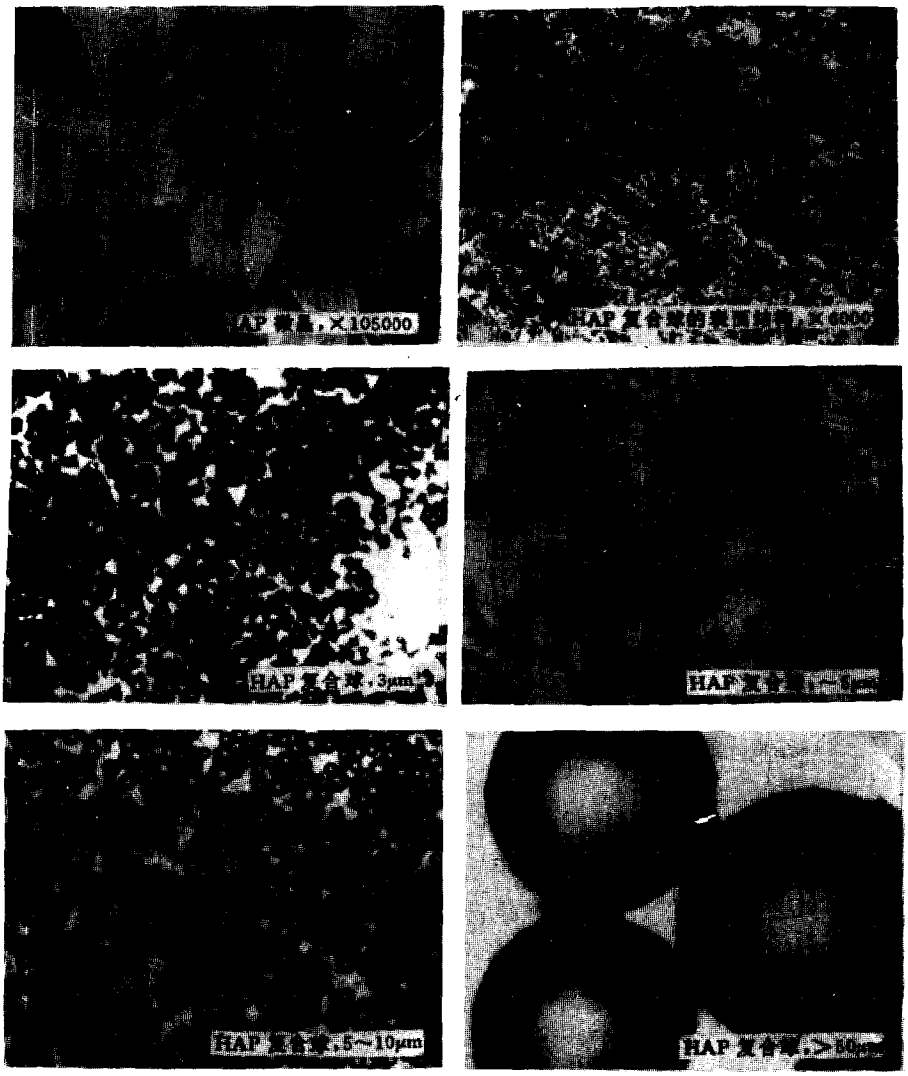


图 12－5　复合球形羟基磷灰石的外貌

第四节　羟基磷灰石的商品化情况

已收集到的羟基磷灰石样品和资料列于表 12－1。

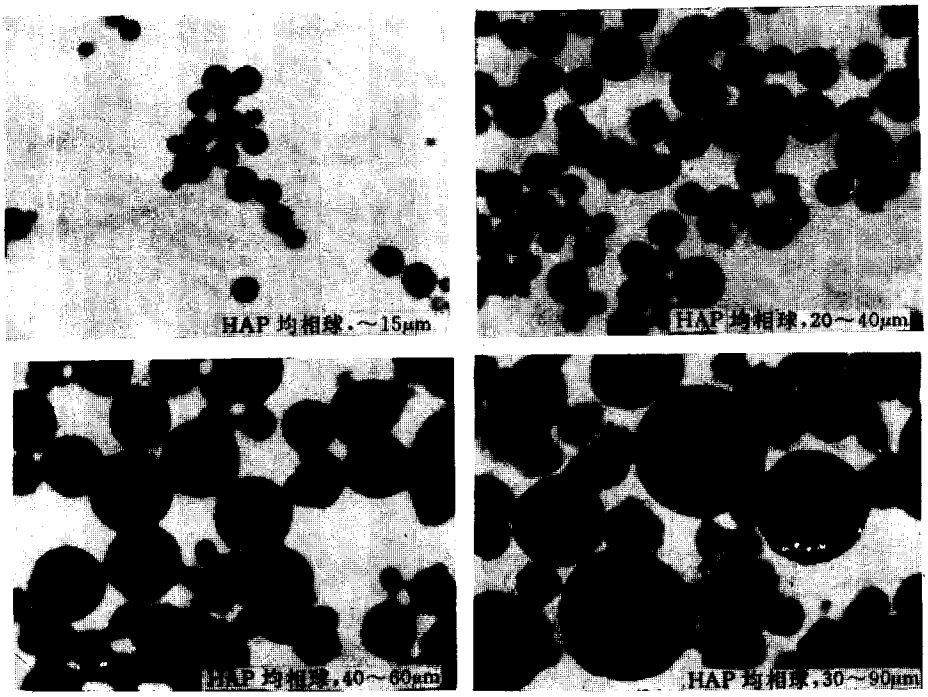


图 12-5a　均相法球形羟基磷灰石的外貌

表 12-1　羟基磷灰石生产厂家及产品的名称、牌号、性状

厂　家	名称、牌号、性状
Bio Rad	Bio-Gel HT
	Bio-Gel HTP
	DNA-Grade Bio-Gel HTp
Sigma	Type Ⅰ Tiselius 型，片状
	Type Ⅱ Tiselius 改进型，片状
HA-Ultrogel	与 agarose 交联成球，60~180μm
Tech. Devp. Testing Center	KOBECERAM，球形
Mitsui Toatsu Chemicals	六角棒形
Koken	HASI，球形，~5μm
	HAH Tiselius 型，片状
	方砖形
Central Glass	土豆形
	Rose des sakles
中国科学院生物化学研究所	Tiselius 型，片状
中国科学院生物物理研究所	Tiselius 型，片状
中国科学院化工冶金研究所	复合球，~5μm、10~20μm、>40μm
	均相球，10~20μm、30~60μm
Fluka	High Resolution，片状
	Macrosorb C，250~700μm，颗粒

表 12-1 中部分羟基磷灰石的外貌如中科院生物物理所和生物化学所生产的羟基磷灰石

的外貌如图 12－6 所示；Sigma 公司、Bio Rad 公司和 Fluka 公司生产的羟基磷灰石的外貌如图 12－6a 所示。从图可以看到，除 Fluka 公司的 Macrosorb C 为球形外均为片状不规则晶体，属于 Tiselius 型或 Tiselius 改型羟基磷灰石。

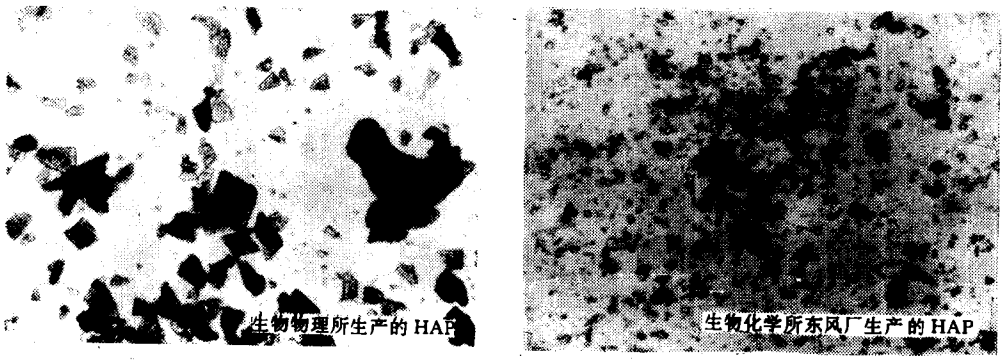


图 12－6　国产市售羟基磷灰石的外貌

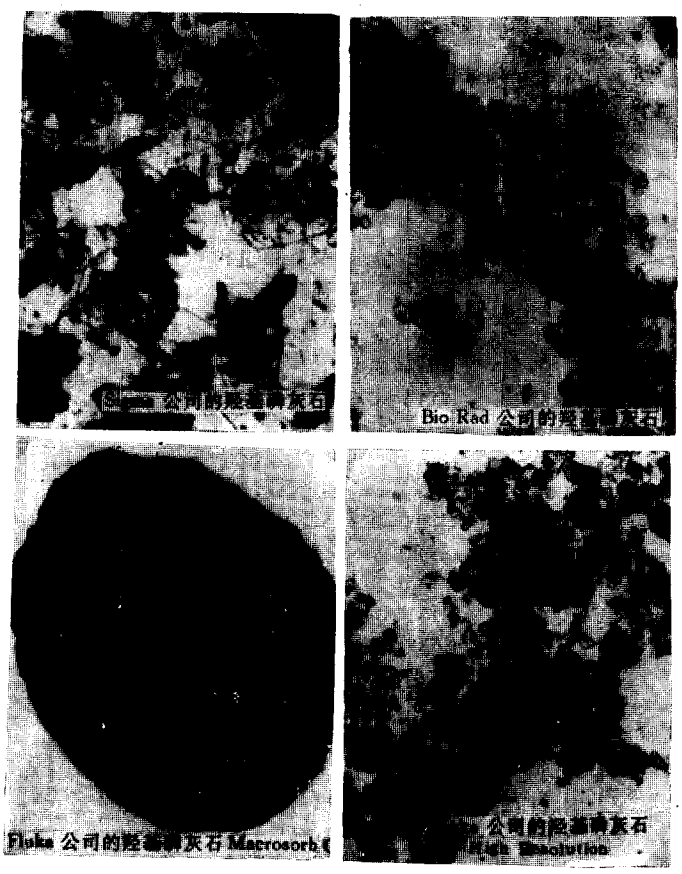


图 12－6a　国外市售的羟基磷灰石的外貌

第五节　羟基磷灰石柱色谱机理的研究

一、实验

羟基磷灰石柱色谱机理的研究是以大量的实验为基础的，大部分工作是在70年代初由Bernardi、80年代初由Gortunoff和Timasheff以及近年来Kawasaki等人作出的。实验样品是DNA、核苷酸、多肽以及多种蛋白质。

DNA：实验结果表明，羟基磷灰石柱上的色谱过程类似于阴离子交换色谱，含磷酸根离子的核酸/核苷酸与来自淋洗液的磷酸根在羟基磷灰石的表面产生竞争，从而产生核酸/核苷酸的淋出峰，淋洗液中的阳离子和氯离子都不参与色谱过程。

多肽：实验结果表明，多肽通过其带电基团（如羧基和碱基）吸附于羟基磷灰石表面。酸性多肽的淋出机理类似核酸，即竞争发生在酸性多肽和磷酸根之间，羧基起主要作用。碱性多肽可以用NaCl、KCl或$CaCl_2$淋出液淋出，竞争发生在碱性多肽和阳离子之间。

蛋白质：实验结果表明，酸性蛋白质在羟基磷灰石柱中的色谱行为与核酸和酸性多肽相似，即对于酸性蛋白质在羟基磷灰石柱上的色谱行为与阴离子交换色谱法类似。碱性蛋白质在羟基磷灰石柱上的色谱机理类似阳离子交换法，竞争发生在碱性蛋白质与淋洗液中的阳离子之间，因此可用3mol/L NaCl、3mol/L KCl或稍低浓度的$CaCl_2$淋出。

二、假定、推论和结论

根据上述实验结果以及后续的一些研究论证，羟基磷灰石在水体系中的色谱机理可归纳为下列几个方面。

1. 存在两种不同的吸附晶面

羟基磷灰石晶体存在两种不同的吸附面，即a晶面和b晶面。亦即存在两种不同的吸附点C-点和P-点。前者起阴离子交换剂作用，后者起阳离子交换剂作用。

晶面上的吸附点分别按单位晶胞（单位晶胞$a=b=0.942nm, c=0.688nm$）的最小间距排列。而无机离子的大小为$K^+=0.26nm$，$Na^+=0.19nm$，$Ca^{2+}=0.20nm$，$Mg^{2+}=0.13nm$，$H_2PO_4^-=0.5nm$，$HPO_4^{2-}=0.5nm$。蛋白质分子大小为分子量10～100kDa[①]＝30nm～数十纳米。因此每一无机离子占据一个吸附点，而较大分子量的蛋白质分子可以占多个吸附点。

2. 两种不同晶面吸附方式不同

蛋白质分子和淋洗剂中的离子以两种不同方式吸附于羟基磷灰石的不同晶面上，酸性分子和阴离子吸附于C-点（位于a晶面），碱性分子和阳离子吸附于P-点（位于c晶面）。

3. 两种不同吸附点的起因

从羟基磷灰石的化学结构[$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]可以导出两种不同吸附点存在的原因。起阴离子交换剂作用的称为C-点，带正电荷，为构成羟基磷灰石晶体的钙离子所致；起阳离子交换剂作用的称为P-点，带负电荷，由晶体中的PO_4^{3-}离子所致。试验表明晶体结构中的OH^-不参与吸附过程。

4. 色谱历程为离子间竞争过程

蛋白质分子以不同方式吸附于羟基磷灰石上，酸性吸附于C-点，碱性吸附于P-点；淋洗

① Da：Dalton，道尔顿。

剂 KP(KH_2PO_4、K_2HPO_4 溶液)或 NaP(NaH_2PO_4、Na_2HPO_4 溶液)中的 PO_4^{3-} 吸附于 C -点,而阳离子 K^+ 或 Na^+ 只能吸附于 P -点。因而在色谱过程中酸性分子与 PO_4^{3-}、碱性分子与 K^+ 或 Na^+ 之间产生竞争;色谱过程中羟基磷灰石的 C -点或 P -点通常先由样品分子覆盖,而晶体的其余部分由竞争离子覆盖。

在梯度淋洗色谱法中,吸附于柱进口的样品分子因来自淋洗剂离子浓度递增的竞争而被赶出原吸附点,因而展现出解吸色谱。

5. 两种吸附方式之间遵从统计力学定律

根据统计力学定律,两种不同吸附方式之间遵从 Boltzmann 分布,PI(Isoelectric Point,等电点)<7 主要吸附于 C -点;PI>7 主要吸附于 P -点。核酸或核苷酸,通过含磷基团吸附于 C -点。

6. 两种不同吸附点存在的实验证实

Kawasaki[23a]通过一系列实验直接证实了两种不同吸附点的存在。

7. 双梯度 HPLC 技术

所谓双梯度 HPLC 技术,就是在同一色谱分离过程中先后采用两种不同性质的淋洗剂(如阴离子交换淋洗剂和阳离子交换淋洗剂)进行梯度淋洗。如样品含 BSA(PI=4.7)、细胞色素 C(PI=9.8~10.1)和溶菌酶(PI=10.5~11.0),第一梯度用 KCl 溶液先淋出碱性分子溶菌酶和细胞色素 C;第二梯度用 KP 淋洗剂淋出酸性分子 BSA,如图 12-7 所示[34]。这一结果充分证实了上述的羟基磷灰石的基本色谱机理。

8. HAP 色谱法的高特征性

在 HAP 晶体面上,欲分离分子可取许多不同的吸附配置,即分子以许多不同的局部面面向 HAP 晶体,在 HAP 晶面上取不同的方位。在诸多配置中服从 Boltzmann 分布,且能量最稳定吸附配置达最高几率。

由于 HAP 晶面的规则的立体化学结构,可以分辨被吸附分子局部表面上原子几何排列的微小差别,因而具有类似于亲和色谱的特性。

正是这些特性在电泳、凝胶色谱、离子交换和反相 HPLC 中只能得到一个峰的肿瘤坏死因子(Tumour necrosis factor,h-TNF)样品,用 HAP 色谱可得到 4 个峰。即 HAP 色谱可分辨结构上微妙差别的蛋白质。

9. 羟基磷灰石 HPLC 线性梯度色谱理论

这主要涉及以下两个方面。

(1) 吸附和解吸的定量研究[23~27]

根据大量的试验结果,针对两种不同吸附点提出了竞争模型(Competition Model),其主要内容为:

① 在羟基磷灰石晶体表面的吸附中心以某种规则方式排列,样品分子的吸附基团与淋洗液中的梯度组分为占有这些吸附点而产生竞争。

② 在低进样量情况下,每一样品组分的分子独立地从柱的进口向柱的出口移动直到其在流动相与静止相间达到热力学平衡。

在这种条件下导出了吸附强度表达式。

(2) 浓度梯度作用的定量研究[28~33]

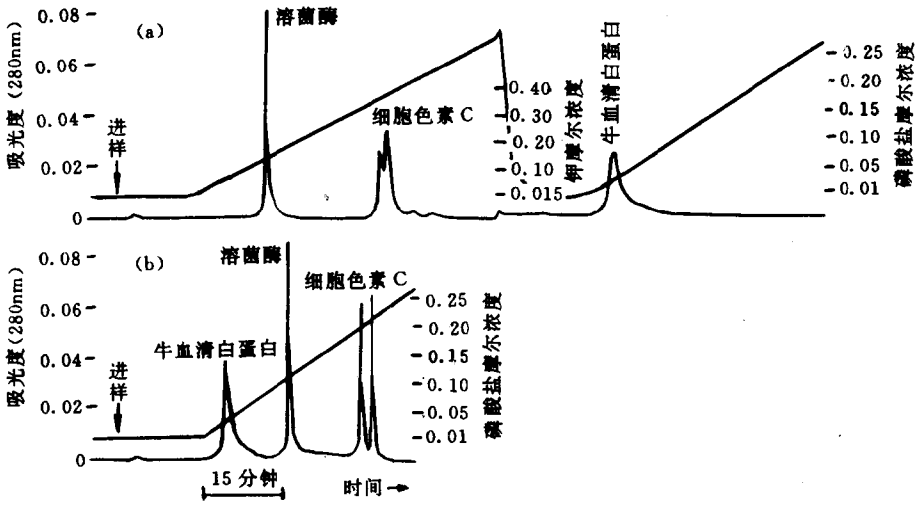


图 12-7 双梯度技术验证 HAP 的色谱机理

(a)BSA(0.17mg)、细胞色素 C(56μg)和鸡溶菌酶(26μg)混合样品的双梯度色谱

实验条件:柱直径=6mm,柱长=3+10(cm),HAP 填充;

$m_{in(KCl)}$=10mmol,$g'_{(KCl)}$=10.4mmol/ml($g'_{(KCl)}$(直径=1cm)=3.75mmol/ml);

$m_{in(KP)}$=10mmol,$g'_{(P,KP)}$=6.94mmol/ml($g'_{(P,KP)}$(直径=1cm)=2.5mmol/ml);

流速=0.97ml/min;

压力=1.8~2.1MPa;

温度=24.3℃; 回收率=96%

(b)BSA(0.17mg)、细胞色素 C(56μg)和鸡溶菌酶(26μg)混合样品的 KP 梯度色谱

实验条件:色谱柱同(a);

$m_{in(KP)}$=10mmol,$g'_{(P)}$=6.94mmol/ml($g'_{(P)}$(直径=1cm)=2.5mmol/ml);

流速=0.97ml/min;

压力=1.8~2.1MPa;

温度=24.3℃; 回收率=107%

注:$m_{in(X)}$—淋洗剂 X 的初始容积摩尔浓度;$g'_{(X)}$—淋洗剂 X 的容积摩尔浓度梯度;BSA—牛血清白蛋白

在低进样量情况下导出了淋洗剂浓度、样品吸附强度和竞争组分吸附强度以及竞争离子数目之间的表达式(不考虑样品分子之间的相互作用)。

在过载进样情况下,必须考虑样品分子间的相互作用、分子的不对称形状等因素,建立了两个模型:

① 无定型相模型(Amorphous phase model) 它假定样品分子任意地吸附于 HAP 表面,且相互平行;

② 准晶态相模型(Quasi-Crystalline phase model) 假定棒形分子由于能量排斥作用相互平行排列,且不相互重叠。

当与竞争模型结合考虑时,矩形色谱符合无定型相模型,而带尾巴的直角三角形色谱符合准晶态相模型。在过载进样量情况下,准晶态相模型常常与实验色谱相符合。应用这些模型预测样品淋出的理论色谱,往往能与实验色谱相近,从而证实了模型在某些条件下的正确性。

第六节　羟基磷灰石在生物大分子分离纯化中的应用

羟基磷灰石用于生物分子分离纯化的研究，大致可分为两个阶段：第一阶段，1956年开始至1984年前后，羟基磷灰石主要填充于开口柱。从大量数据导出了基本色谱机理。第二阶段，从1984年前后至今，羟基磷灰石专用介质主要应用于HPLC柱填充。应用近代色谱理论建立了数学模型，尝试利用样品的一些物化特性来预测色谱分离状况。

一、一般应用领域

在水体系中，羟基磷灰石用于生物分子的色谱分离纯化的大量工作集中在糖类、多肽和蛋白质。1985～1990年5年间"Journal of Chromatography"刊载索引的应用报告列于表12－2，通过表列内容可以看到HAP应用的领域及状况。

从表12－2可看出，酶的分离纯化应用占很大比重，其次是蛋白质，而1990年的报道几乎全是蛋白质分离纯化应用。

二、单克隆抗体的分离纯化

羟基磷灰石柱色谱为单克隆抗体(Monoclonal Antibodies，MoAb)分离纯化的3个主要

表12－2　HAP应用于生物大分子分离纯化的部分情况

	样　　品	文　献
糖类：	单糖、低糖	35
	多糖、粘多糖、类多糖	36～38
	糖蛋白	39～41
氨基酸、多肽：	氨基酸及其衍生物	42
	多肽、多肽和蛋白质荷尔蒙、增长因子	43～45
蛋白质：	一般技术	46～56
	细胞蛋白、病毒和亚细胞颗粒	57～59
	基因工程合成蛋白质(单克隆抗体除外①)	60
	细菌和植物蛋白	61～72
	血液、血清和血清蛋白	73～80
	肌蛋白	81,82
	精蛋白、组蛋白和其它核蛋白	83～85
	色蛋白和金属蛋白	86～91
	腺蛋白、腺产物及各种酶原	92～95
	脑、脑脊髓液和眼蛋白	96～107
	瘤组织和变态细胞蛋白	108
	特殊粘结和受体蛋白	109～125
	其它蛋白(包括酶活性蛋白抑制剂)	126,127
酶：	氧化还原酶	128～171
	转移酶	172～193
	转移磷的转移酶	194～216
	水解酶	217～264
	裂合酶	265～273
	异构酶	274～277
	连接酶	278～284
	复杂混合物和未确定酶	285～287

①单克隆抗体分离纯化见第六节的二。

方法之一，另二种是 Protein A 和阴离子交换树脂(DEAE)。Poiesi[288]比较了这 3 种方法。对于蛋白质回收、MoAb 纯度和免疫反应性，3 种方法相近，其差异在于 HAP 能纯化 IgM，淋洗条件非常温和，可保存 MoAb 活性；Protein A 能纯化 IgG 亚类(鼠 IgM 不能定量纯化)；DEAE 能纯化 IgG 和 IgM，淋洗条件温和，可保存 MoAb 活性，但常夹带铁传递蛋白。

HAP 用于单克隆抗体纯化已达制备级或工业规模。Bio Rad 公司已出售 Maps 单克隆抗体纯化的专用设备，其色谱柱为 Tiselius 型羟基磷灰石填充。

HAP 色谱纯化 MoAb 有下列几个特点。

1. 方法简单、快速

Juares - Salinas[289]等人报道，高性能 HAP 色谱法是揭示用常规方法从鼠腹水纯化的单克隆抗体是异质性的简单方法。Brooks[290]认为，用 HAP 从单克隆抗体中能很好地除去污染物。Bukovsky 等人[291]从鼠腹水和细胞培养上清液用 HAP 色谱法仅一步梯度淋洗就简单、快速纯化了灰鼠或人单克隆抗体。用 Protein A 结合于 HAP 基质可使 IgG 快速而有效地纯化。Yamakawa 等人[292]综述了这一简单而有效的羟基磷灰石 HPLC 用于单克隆抗体 IgG 和 IgM 的分离和纯化方法。

2. 分离 MoAb 亚类

Yamakawa 等人[293]用球形 HAP 填充的 HPLC 柱成功地从血清蛋白定量纯化了 16 种单克隆抗体(包括 IgG 和 IgM 的四个亚类)。Iino[294]用 HAP 填充的柱从鼠腹水中分离纯化单克隆抗体(IgG、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_3和 IgM)，分辨率令人满意。Juarez - S 等人[295]用 HAP 填充柱 HPLC 非常好地分离了由杂交产生的 IgG 遗传型，这是其它色谱技术不能达到的。

Engelhorn 等人[296]报道了用梯度淋洗 HAP 色谱法纯化同型仅轻链组分不同的单克隆抗体。

采用双梯度技术，Kawasaki[2]分离纯化了单克隆抗体 IgG_1、IgG_2和 IgG_3亚类。

3. 单克隆抗体纯度及活性高

Stanker 等人[297]报道应用 HAP 柱色谱一步直接从鼠腹水中纯化鼠单克隆抗体，得到高纯度产物。Poiesi 等人[288]应用 HAP 柱 HPLC 纯化单克隆抗体，纯度达 98.3%(HP - GPC 分析)，比活性为 318000。Engelhorn 等人[296]从同一类型抗原的抗体中纯化的单克隆抗体保持初始活性在 90%以上。

4. 低成本

从单克隆抗体分离纯化的 3 个主要方法中使用的填充介质来看，HAP 的价格远低于 Protien A 和 DEAE 类，如 Mono Q。

当前 HAP 色谱用于单克隆抗体分离纯化的大部分工作用的仍然是 Tiselius 型 HAP。利用大小均匀、小粒径球形 HAP 的 HPLC 已显示出更高的纯化效果。

三、结构差异很小的蛋白质分离

基于羟基磷灰石的晶体特性和立体化学结构，分子可采取多种方式吸附于其晶体表面，即分子以不同面面向晶体表面，并以不同方向排列，在这些吸附配置之间服从 Boltzmann 分布，且能量最稳定状态配置的几率最高。当面向晶体表面的分子处在最稳定配置时该分子的立体化学结构能被 HAP 表面规则性的结构所识别，所以结构上只有微纱差别的分子用 HAP 色谱法能够得到分离。

例如，人体肿瘤坏死因子(h－TNF)的蛋白分子结构上差异很小，应用 HAP 色谱法可以得到分离，有 4 个色谱峰，如图 12－8 所示，而用电泳、离子交换色谱法和反向 HPLC 只能得到一个峰，这充分说明 HAP 色谱的特殊能力。

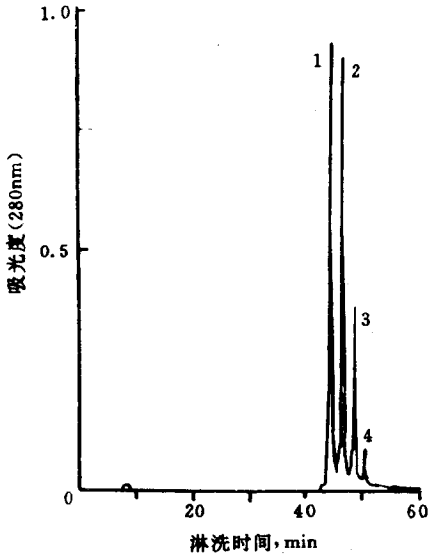


图 12－8　h－TNF 的 HAP 色谱分离[23]
柱直径＝7.5mm，柱长＝10cm；
磷酸钠缓冲溶液线性梯度淋洗：10～400mmol/L；
淋洗时间＝60min；
流速＝0.5cm/min

四、有机溶剂体系中的羟基磷灰石 HPLC

在有机溶剂体系中羟基磷灰石 HPLC 的应用目前并未开展大量工作，但已经认为在有机体系中 HAP 的色谱机理是与水体系中的机理完全不同的。

参考文献

1　Tiselius, A. et al., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 132
2　Kawasaki, T. et al., J. Chromatogr., 1990, 515, 91
3　Bernardi, G. et al., Methods Enzymol., 1971, 21, 95
4　Bernardi, G. et al., Methods Enzymol., 1971, 22, 325
5　Bernardi, G. et al., Methods Enzymol., 1973, 27, 471
6　Moss, B. et al., J. Biol. Chem., 1972, 247, 5194
7　Martinson, H. G. et al., Biochemistry, 1973, 12, 139
8　Martinson, H. G. et al., Biochemistry, 1974,13, 1641
9　Spencer, M., J. Chromatogr., 1978, 166, 423
10　Spencer, M. J. Chromatogr., 1978, 166, 435
11　Gorbunoff, M. J., Anal. Biochem., 1984, 136, 423
12　Gorbunoff, M. J., Anal. Biochem., 1984, 136, 433
13　Gorbunoff, M. J. et al., Anal. Biochem., 1984, 136, 440
14　Kawasaki, T. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 157, 291
15　Kadoya, T. et al., J. Liq. Chromatogr., 1986, 9, 3543

16 Kawasaki, T. et al., Biochem. Int., 1987, 15, 1137
17 Sato, T., Bunseki Kagaku, 1989, 38, 34
18 Majumder, K. et al., Chromatographia, 1987, 24, 400
19 Kawasaki, T. et al., EP 0274608 A1
19a EP 274608
19b JP 63182563
19c DE 3722102
20 井上海千也等人, J. Ceramic Soci. Japan, 1987, 95, 759
21 余贤真, 863 计划生物技术领域年会, 论文摘要(1988～1989), 北京:生物技术领域专家委员会, 1989, 12, 122 页
22 贾忠江, 余贤真, 863 计划生物技术领域年会, 论文摘要(1989～1990), 北京:生物技术领域专家委员会, 1990, 10, 149 页
23 Kawasaki, T., Sep. Sci. Technol., 1988, 23, 601
23a Kawasaki, T. et al., J. Chromatogr., 1990, 515, 125
24 Kawasaki, T., Sep. Sci. Technol., 1988, 23, 617
25 Kawasaki, T., Sep. Sci. Technol., 1988, 23, 1105
26 Kawasaki, T., Biopolymers, 1970, 93, 277
27 Kawasaki, T., J. Chromatogr., 1974, 93, 337
28 Kawasaki, T., J. Chromatogr., 1974, 93, 313
29 Kawasaki, T., Sep. Sci. Technol., 1987, 23, 121
30 Kawasaki, T., Sep. Sci. Technol., 1988, 23, 451
31 Kawasaki, T., Sep. Sci. Technol., 1988, 23, 2365
32 Kawasaki, T., Sep. Sci. Technol., 1989, 24, 1109
33 Kawasaki, T. et al., Sep. Sci. Technol., 1989, 25, 397
34 Kawasaki, T. et al. J. Chromatogr., 1991, 544, 147
35 Brooks, T. L. et al., Int. Lab., 1985, 18, 72～81
36 Chace, K. V. et al., Biochemistry, 1985, 24, 7334～7341
37 Funae, Y. et al., J. Chromatogr., 1986, 381, 149～152
38 Wantyghem, J. et al., Biochem. J., 1986, 237, 483～489
39 Tarone, G. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 172, 713～718
40 Sasena, S. et al., Biochem. J., 1987,247, 563～570
41 Kraujelis, K. et al., J. Steroid Biochem., 1989, 32, 121～125
42 Gerlach, M. et al., J. Chromatogr., 1986, 380, 379～385
43 Bogner, W. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 161, 611～620
44 Guinet, F. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 172, 686～694
45 Mayer, H. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 181, 409～415
46 Kawasaki, T. et al., Eur. J. Biochem., 1985, 152, 361～371
47 Gorbunoff, M. J., Methods Enzymol., 1985, 117, 370～380
48 Kadoya, T. et al., J. Liq. Chromatogr., 1986, 9, 3543～3557
49 Hjerten, S. et al., J. Chromatogr., 1988, 440, 305～313
50 Kadoya, T. et al., J. Liq. Chromatogr., 1988, 11, 2951～2967
51 Chicz, R. M. et al., Anal. Chem., 1989, 61, 1742～1749
52 Horrigome, T., Eur. J. Biochem., 1989, 186, 63～69
53 Kato Y. et al., J. Chromatogr. Sci., 1989, 27, 659
54 Hiramuma, T. et al., J. Chromatogr., 1990, 515, 399～406
55 Inoue, S. et al., J. Chromatogr., 1990, 515, 193～204
56 Kadoya, T., J. Chromatogr., 515, 1990, 521～525

57 De Pinto, V. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 183, 179～187
58 Heukeshoven, J. et al., Chromatogaphia, 1988, 25, 230～236
59 Horigome, T. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 186, 63～69
60 Svoboda, M. et al., Anal. Biochem., 1986, 159, 402～411
61 Miyazono, K. et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 6407～6415
62 Wolf, C. R. et al., Biochem. J. 1986, 240, 27
63 Miyazono, K. et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 4098～4103
64 Parandoosh, Z. et al., Drug Metab. Disp., 1987, 15, 59～67
65 Ramadoss, C. S. et al., Biochem. J., 1987, 243, 723～728
66 Husain, A. et al., Anal. Biochem., 1986, 155, 206～211
67 Daniel, J. L. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 156, 677～684
68 Willing, A. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 175, 167～173
69 Videira, A. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 181, 493～502
70 Achulz, H. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 171, 589～597
71 Chong, P. et al., J. Chromatogr., 1990, 512, 227～236
72 Kanaho, Y. et al., Biochem. J., 1989, 259, 499～506
73 Ohmori, T. et al., J. Biol. Chem., 1989, 264, 1877～1881
74 Iino, S., Bio Ind., 1989, 5, 903～909; CA:110(1989)152321
75 Yamakawa, Y, et al., J. Liq. Chromatogr., 1988, 11, 665～681
76 Josic, D. et al., Chromatographia, 1988, 25, 243
77 Limeback, H. et al., Biochem. J., 1987, 243, 385～390
78 Pearlstone, J. R. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 16795～16810
79 Dalla Libera, L., J. Chromatogr., 1986, 366, 417～421
80 Domenicucci, C. et al., Biochem. J., 1988, 253, 139～151
81 Gaczynski, M., Experientia, 1986, 42, 402～403;CA105(1986)21175n
82 Hirose, M., J. Biochem. (Tokyo)., 1988, 103, 31～35
83 Ambler, A. P. et al., Biochem. J., 1985, 232, 451～457
84 Sgouros, J. G. et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1986, 367, 223～228
85 Yamaqguchi, T. et al., J. Biol. Chem., 1989, 264, 112～118
86 Samuels, M. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 2003～2013
87 Ando, K. et al., Biochemistry, 1987, 26, 226～230
88 Ding, X. and Coon, M. J., Biochemistry, 1988, 27, 8330～8337
89 Moura, I. et al., Eur. J. Biochem. J., 1988, 177, 673～682
90 Ambler, R. P. et al., Biochem. J., 1989, 261, 495～499
91 Link, R. P. et al., Anal. Biochem., 1986, 157, 262～269
92 Pousette, A. et al., J. Steroid Biochem., 1985, 23, 115～119
93 Nendza, R. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 169, 85～95
94 Hatayama, T. et al., J. Chromatogr., 1989, 481, 403～410
95 Frappier, T. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 169, 651～657
96 Kikuchi, A. et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 2897～2904
97 Cooper, J. A. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 477～485
98 McDonald, J. R. et al., Biochem. J., 1985, 232, 559～567
99 McDonald, J. R. et al., Biochem. J., 1985, 232, 569～575
100 Regnouf, F. et al., Eur. J. Biochem., 1985, 153, 313～319
101 Evans, T. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 7052～7059
102 Katada, T. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 8182～8191

103 Pandolfo, M. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 162, 213～220
104 Doi, Y. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 164, 89～94
105 Tokuda, M. et al., Biochem. J., 1987, 244, 401～408
106 Roberston, N. M. et al., Biochem. J., 1987, 246, 55～65
107 Shinkawa, K. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1987, 930, 446～453
108 Nguyen-Gia, P. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 161, 771～777
109 Tokuda, M. et al., Biochem. J., 1987, 246,67～74
110 Chen. T. J. et al., Chin. J. Physiol., 1987, 30, 55～67
111 Fantl, V. E. et al., J. Steroid Biochem., 1988, 31, 187～193
112 Macaulay, J. O. et al., J. Steroid Biochem., 1988, 29, 497～503
113 Paton, B. C. et al., Biochem. J., 1988, 254, 77～84
114 Kato, E. A. et al., J. Steroid Biochem., 1988, 29, 213～220
115 Yonezawa, N. et al., Biochem. J., 1988, 251, 121～127
116 Janssen, G. M. C. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 171, 119～129
117 Moser, E. H. et al., J. Steroid Biochem., 1989, 32, 759～767
118 Ohara-Nemoto, Y. et al., J. Steroid Biochem., 1988, 31, 295～304
119 Yamamoto, K. et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 9926～9932
120 Bush, L. et al., Biochem. J., 1988, 256, 797～805
121 Golsteyn, R. M. et al., Biochem. J., 1988, 257, 809～815
122 Miron, T. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 178, 543～553
123 Newton, D. L. et al., Prepar. Biochem., 1988, 18, 247～259
124 Tollefson, J. H. et al., J. Lipid Res., 1988, 29, 1593～1602
125 Lindberg, U. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1988, 967, 391～400
126 Yonezawa, N. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 177, 1～7
127 Yamazaki, F. et al., Biochem. J., 1985, 230, 635～638
128 Blackmore, R. et al., Biochem. J., 1986, 233, 547～552
129 Groen, B. W. et al., Biochem. J., 1986, 234, 611～615
130 Ishii-Ohba, H. et al., J. Steroid Biochem., 1986, 24, 753～760
131 Kurzban, G. P. et al., J. Chromatogr., 1986, 358, 296～301
132 Prochaska, HJ. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 1372～1378
133 Sawers, R. G. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 156, 149～155
134 Kruger, S. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 157, 481～485
135 Kurzban, G. P. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 7824～7830
136 Geiger, O. et al., Biochemistry, 1986, 25, 6043～6048
137 Inano, H. et al., J. Steroid Biochem., 1986, 25, 21～28
138 Amuro, Y. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1987, 917, 101～107
139 Hashimoto, T. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 164, 277～285
140 Ishii-Ohba, H. et al., J. Steroid Biochem., 1986, 25, 555～560
141 Jacobs, J. M. et al., Biochem. J., 1987, 244, 219～224
142 Finocchiaro, G. et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 7982～7989
143 Poels, P. A. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 166, 575～579
144 Simpson, H. D. et al., Biochem. J., 1987, 244, 585～590
145 Teixeira, M. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 167, 47～58
146 Tsubaki, M. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1987, 914, 246～258
147 Ishii-Ohba, H. et al., J. Steroid Biochem., 1987, 27, 775～779
148 Nagai, K. et al., J. Steroid Biochem., 1987, 20, 333～336

149 Juvonen, R. O. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 171, 205～211
150 Willing, A. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 170, 603～611
151 Heidlas, J. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 172, 633～639
152 Yagi, T. et al., Biochmistry, 1988, 27, 2008～2013
153 Myllyla, R. et al., Biochem. J., 1988, 253, 489～496
154 Ogushi, S. et al., Chem. Pharm. Bull., 1988, 36, 1445～1450
155 Parris, N. et al., J. Chromatogr., 1988, 444, 219～223
156 Postlind, H. et al., Biochem. J., 1988, 253, 549～552
157 Sheenan, M. C. et al., Biochem. J., 1988, 252, 661～666
158 Nardini, M. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 173, 689～694
159 Thomas, J. L. et al., J. Steroid Biochem., 1988, 31, 785～793
160 Ventom, A. M. et al., Biochem. J., 1988, 255, 949～956
161 Narimatsu, S. et al., Drug Metab. Disp., 1988, 16, 880～889
162 Cinclair, P. et al., Biochem. J., 1988, 258, 237～245
163 Combalbert, J. et al., Drug Metab. Disp., 1989, 17, 197～207
164 Fricdrich, T. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 180, 173～180
165 Halpert, J. et al., Drug Metab. Disp., 1989, 17, 26～31
166 Hasler, T. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 180, 205～211
167 Bogard, M. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 181, 417～421
168 Rietjens, I, C. M. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 181, 309～316
169 Trower, M. K. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 181, 199～206
170 Priestley, N. D. et al., Biochem. J., 1989, 261, 853～860
171 Hayes, J. D., Biochem. J., 1986, 233, 789～798
172 Ishii, K. et al., Biochem. J., 1986, 233, 773～777
173 Veser, J. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 154, 657～663
174 Ricci, G. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 157, 57～63
175 Sugata, S. et al., Chem. Pharm. Bull., 1986, 34, 1219～1222
176 Fanany, C, N. et al., Biochem. J., 1986, 238, 65～73
177 Miyaura, S. et al., Chem. Pharm. Bull., 1986, 34, 194～205
178 Hussey, A. J. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1986, 874, 1～12
179 Scheideler, M. A. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 10990～10995
180 Jacobs, D. et al., J. Biochem. J., 1986, 238, 613～616
181 Kuswik－Rabiega, G. et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 1505～1509
182 Baur, H. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 166, 111～117
183 Golderer, G. et al., Biochem. J., 1988, 253, 859～867
184 Mukherjee, T. et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 708～713
185 Burtscher, H. J. et al., Biochem. J., 1987, 248, 859～864
186 Andersson, C. et al., Biochem. J., 1988, 249, 819～823
187 Ghosh, S. K. et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 19024～19033
188 Lee, F. S. et al., J. Boil. Chem., 1988, 263, 14949～14955
189 McLellan, L. I. et al., Biochem. J., 1988, 258, 87～93
190 LaCreta, F. P. et al., J. Chromatography, 1988, 434, 83～93
191 Haselbeck, A., Eur. J. Biochem., 1989, 181, 663～668
192 Benson, A. M. et al., Biochem. J., 1989, 261, 1023～1029
193 Rider, M. H. et al., Biochem. J., 1985, 231, 193～196
194 Bruce, J. S. et al., Eut. J. Biochem., 1985, 152, 75～82

195 Cheng, C. -F. et al., J. Biol. Chem., 1985, 260, 10720～10727
196 Garcia-Segura, J. M. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 158, 367～372
197 Lundberg, G. A. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 161, 257～262
198 Delpech, M. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 160, 333～341
199 Klimczak, L. J. et al., Biochemistry, 1986, 25, 4850～4855
200 Romhanyi, T. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1986, 888, 325～331
201 Larsen, C. E. et al., J. Biol. Chem., 1987, 261, 15402～15409
202 Das, S. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1987, 927, 74～80
203 Holer, E. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 163, 397～405
204 Radojkovic, J. et al., Biochem. J., 1987, 242, 895～903
205 Benovic, J. L. et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 9026～9032
206 Geller, D. H. et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 7374～7382
207 De Belle, I. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1987, 925, 17～26
208 Azhar, S. et al., Biochemistry, 1987, 26, 7047～7057
209 Horikoshi, M. et al., Chem. Pharm. Bull., 1987, 35, 4181～4187
210 Morris, A. J. et al., Biochem. J., 1988, 251, 157～163
211 Bohman, C. et al., Biochemistry, 1988, 27, 4258～4265
212 Dianoux, A, -C. et al., Biochemistry, 1988, 28, 424～431
213 Mason, P. A. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1989, 1010, 108～115
214 Cazaubon, S. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 182, 401～406
215 Marais, R. M. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 182, 129～137
216 Clements, P. R. et al., Eur. J. Biochem., 1985, 152, 21～28
217 Matsuo, K. et al., Eur. J. Biochem., 1985, 153, 217～222
218 Tellez-Inon, M. T. et al., Biochem. J., 1985, 232, 425～430
219 Miki, A. et al., Eut. J. Biochem., 1986, 160, 41～48
220 Okada, M. et al., Biochem. J., 1986, 239, 155～162
221 Sideris, D. C. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 164, 309～315
222 Carter, H. R. et al., Biochem. J., 1987, 244, 639～645
223 Price, C. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 167, 111～115
224 Habraken, Y. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 171, 59～66
225 Freeman, C. et al., Biochem. J., 1987, 246, 355～365
226 Freeman, C. et al., Biochem. J., 1987, 246, 347～354
227 Sobek, H. et al., Biochem. J., 1988, 250, 453～458
228 Rymsa, B. et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1988, 369, 115～121
229 Herrero, C. et al., Biochem. J., 1988, 255, 807～812
230 Hayman, A. R. et al., Biochem. J., 1989, 261, 601～609
231 Sobek, H. et al., Biochem. J., 1989, 261, 993～998
232 Della Ragione, F. et al., Biochem. J., 1985, 232, 335～341
233 De Mot, R. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 164, 643～654
234 Patchett, M. L. et al., Biochem. J., 1987, 243, 779～787
235 Muller, H. M. et al., Biochem. J., 1987, 246, 319～324
236 Melasniemi, H., Biochem. J., 1988, 250, 813～818
237 Erfle, J. D. et al., Biochem. J., 1988, 255, 833～841
238 Hershfield, M. S. et al., Biochem. J., 1985, 230, 43～52
239 Priestman, D. A. et al., Biochem. J., 1985, 231, 689～694
240 Geuss, U. et al., Eur. J. Biochem., 1985, 153, 327～334

241 Freeman, C. et al., Biochem. J., 1986, 234, 83～92
242 Inouye, Y. et al., Chem. Pharm, Bull., 1986, 34, 269～274
243 Yamaguchi, N. et al., Cancer Res., 1986, 46, 5353～5359
244 Heini, H. G. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 162, 541～546
245 Tanaka, K. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261, 15197～15203
246 Fagan, J. M. et al., Biochem. J., 1987, 106, 335～343
247 Yan, T. -R. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 163, 259～265
248 Borkovich, K. A. et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 7081～7086
249 Bruce, J. S. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 165, 633～638
250 Volanakis, J. E. et al., Anal. Biochem., 1987, 163, 242～246
251 Gutman, N. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 171, 577～582
252 Sano, S. -I. et al., Biokhimiya(Moscow), 1987, 52, 2002～2008
253 Cowan, D. A. et al., Biochem. J., 1987, 247, 121～133
254 Kikuchi, M. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 173, 589～598
255 Haeggsrom, J. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 174, 717～724
256 Barelli, H. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 175, 481～489
257 Yoshimoto, T. et al., Chem. Pharm. Bull., 1988, 36, 1456～1462
258 Schladt, L. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 176, 31～37
259 Ramamoorthy, S. et al., Biochem. J., 1989, 258, 777～783
260 Wingfied, P. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 180, 23～32
261 Archabault, de vencay, J., Eur. J. Biochem., 1989, 182, 37～43
262 Prescott, M. et al., Biochem. J., 1989, 259, 831～838
263 Yamasaki, Y. et al., J. High Resolut., Chromatogr., 1989, 12, 256
264 Gibbs, P. N. B. et al., Biochem. J., 1985, 230, 25～34
265 Broschat, K. O. et al., Eur. J. Biochem., 1985, 153, 397～401
266 Takada, Y. et al., Biochem. J., 1986, 235, 391～397
267 Tamisawa, H. et al., Biochem. J., 1986, 235, 569～575
268 Nimmo, G. A. et al., Biochem. J., 1986, 239, 213～220
269 Choi, S. Y. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 160, 515～520
270 Chaudhuri, S. et al., Biochem. J., 1986, 239, 699～704
271 McNaaughton, G. A. L. et al., Biochem. J., 1989, 261, 349～355
272 Van der Straeten, D. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 182, 639～647
273 Schomburg, U. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 160, 451～457
274 Mezzina, M. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 162, 325～332
275 Asmad, S. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 176, 69～70
276 Sullivan. D. M. et al., Biochemistry, 1989, 280, 5680～5687
277 Ghosh, S. K. et al., Biochem. J., 1986, 235, 81～85
278 Kunze, N. et al., Eur. J. Biochem., 1986, 160, 605～613
279 Matvienko, N. I. et al., Eur. J. Biochem., 1987, 165, 565～570
280 Quiby, J. -P. et al., J. Biochem. Chem., 1988, 263, 15277～15288
281 Reichsteiner, T. et al., Eur. J. Biochem., 1989, 181, 41～46
282 Charlier, J. et al., Biochem. J., 1987, 248, 43～51
283 Theobald, A. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 175, 511～524
284 Ihara, M. et al., Biokhimi. Biophys. Acta, 1986, 881, 135～140
285 Bornheim, L. M. et al., Biochem. J., 1987, 239, 661～669
286 Derbyshire, M. K. et al., J. Agric. Food Chem., 1987, 35, 871～877

287 Contero, B. et al., Eur. J. Biochem., 1988, 173, 437～443
288 Poiesi, C. et al., J. Chromatogr., 1989, 465, 101
289 Juares-Salinas, H. et al., Biotechniques, 1984, 2, 164
290 Brooks, T. L. et al., Lab. Proct., 1986, 35, 23
291 Bukovsky, J. et al., Hybridoma, 1987, 6, 219
292 Yamakawa, Y. et al., Seikagaku, 1987, 56, 373
293 Yamakawa, Y. et al., J. Liq. Chromatogr., 1988, 11, 665
294 Iino, S., Bio Ind., 1988, 5, 903
295 Juarez-Salinas, H. et al., Methods Enzymol., 1986, 121, 615
296 Engelhorn, S. C. et al., US 4 745 183
297 Stanker, L. H. et al., J. Immunol. Methods, 1985, 76, 157

第十三章　径向色谱柱的发展与应用

张玉奎　　李　彤

（中国科学院大连化学物理研究所，大连，116023）

姚志建　徐明波

（军事医学科学院基础医学研究所，北京，100052）

第一节　概　述

生物工程的最终目的是要制造出能为人类所利用的产品。这种产品主要是蛋白质或多肽，往往要求应具有极高的纯度，特别是当它们作为医药制品时，更是如此。因此目前普遍认为，在生物工程的研究成果转化成有商品价值的产品的过程中，其下游处理（即对原核或真核细胞产物的分离纯化过程）的花费将在全部生产成本中占有相当大的比重[1]。

下游处理中所涉及的各种分离纯化手段，原则上可分为两类[2~4]。一类是分辨力较低、主要用于初级处理中的方法，如分级沉淀、超滤等；另一类则是分辨力较高、主要用于精细分离中的技术，如色谱技术和电泳技术。在后一类的手段中，色谱技术又因其具有多种不同的分离机理，设备简单，便于进行自动化控制和不会在分离过程中出现发热、相变等有害效应，使其在实际的分离提纯流程中的应用较电泳更为广泛，在生物工程下游处理中占有重要的地位[5,6]。

色谱法是目前在生物样品的分析分离中最常用的技术之一。自其发明后的一百余年来，无论是经典低压、中压色谱柱，还是现代高效液相色谱柱，其结构大致相似。色谱柱主要是由柱管及色谱柱填料组成，流体在柱内的流向是从柱的一端流向另一端。当制备分离是主要目的时，为增加制备量必须对柱结构进行改进，一般有两种方法：(1)　保持柱直径不变，增加柱长；(2)　保持柱长不变，加大柱径。这两种改进后的色谱柱都可以提高分离能力，增加制备量。然而使用第一种方法时，随着色谱柱长度的增加，样品的保留时间延长，压力也增加，故一般不采用。目前比较常用的方法是逐渐增加柱直径，以达到增加处理量的目的。首先用分析型色谱柱摸索分离条件，再根据所需要的制备量，采用经验公式计算出所需要的制备柱直径，进行实验制备。但是实践表明，随着色谱柱直径的增加，在原来的条件下进行的实验往往不合适，特别是希望一步放大较高倍数时，结果更是令人不满意。对于大规模制备，都是先进行逐级摸索分离条件，再逐渐增加色谱柱的直径，这就是采用现代高效液相色谱作制备的突出困难之一。特别是对生物样品的分离纯化过程中，采用液相色谱技术的最终目的往往不是分析而是制备，并且生物样品的要求十分苛刻，对环境的要求（如 pH 值、温度、盐浓度和流动相的组成）均较严，加之生物样品组成极其复杂，分子量较大，敏感部位较多，这样就更增加了应用的难度，迫切需要

发展出新型的色谱柱技术[7]。

第二节　径向色谱柱结构

为解决上述困难，近年来国际上出现了一种称作径向色谱柱（Radial Flow Chromatographic Column）的新技术，从原理上解决了传统色谱柱技术所存在的问题，其实质是色谱分离原理同膜分离过程的结合[8]。

径向色谱柱的结构原理如图 13－1 所示。径向色谱柱采用了径向流动技术，样品和流动相是从柱的圆周围流向柱圆心（而不是如传统色谱柱即轴向色谱柱，样品和流动相是从柱的一端流向另一端），可在较小的柱床层高度时使用较大的流动相流速；同时因圆柱柱表面积一般大于其横截面积，所以在流动相保持较高的体积速度时，反压降较低；当保持制备色谱柱直径不变、只增加柱长时，可以线性增大样品处理量，样品的规模可在保持相似的色谱条件下直接放大，各组分的保留时间及分辨情况与分析时完全相同。图 13－2 是分离小鼠腹水时放大情况[9]。如果需要更进一步放大规模，直到工业生产时，还可将径向色谱柱串联或并联使用。据文献报道，从实验规模到大规模的多柱并联可放大 240 倍[8]。

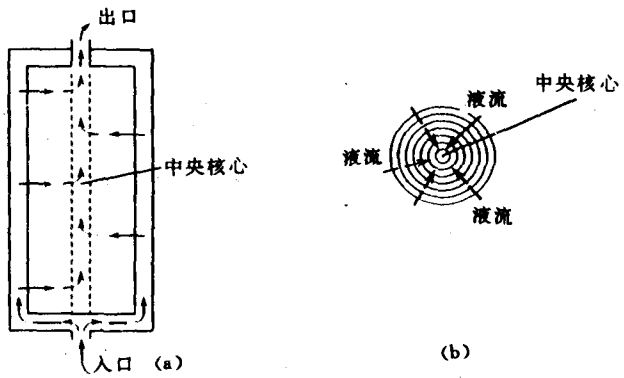


图 13－1　径向色谱柱的结构和原理

(a)　垂直断面图（示意）；　(b)　水平断面图（示意）

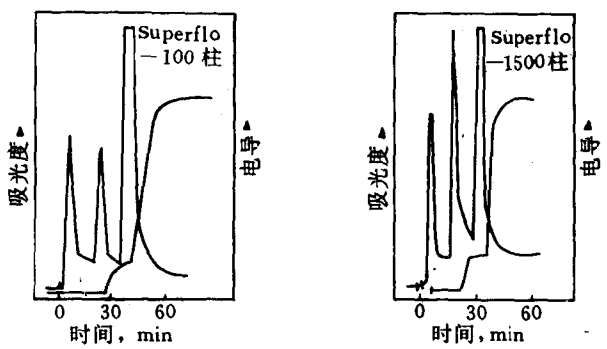


图 13－2　小鼠腹水分离放大情况

由于径向色谱柱的反压较低，允许使用较高的流动相流速，样品出峰较快，对设备的要求较低，通常的低压色谱系统就可满足要求。图 13－3 是典型的径向色谱柱操作装置示意图。

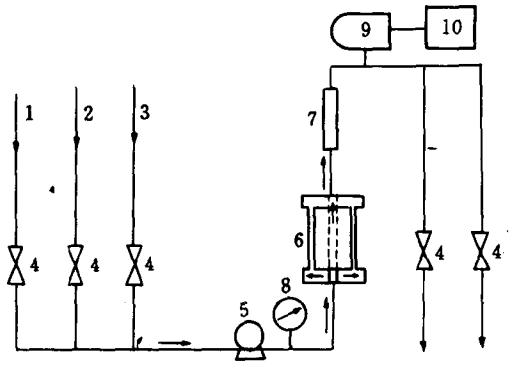


图 13－3　径向色谱柱操作装置图
1—预平衡液；　2—样品；　3—流动相；　4—阀；
5—泵；　6—径向色谱柱；　7—流量计；　8—压力表；　9—检测器；　10—记录议

第三节　径向色谱柱填料

进行生物样品分离纯化的一个重要课题是研究出适合于生物大分子分离纯化的色谱填料。在高效液相色谱发展初期问世的色谱填料对于生物样品的分离大多数已不适用，它们的孔径小、极性高，对生物大分子常造成不可逆性吸附，有时即便能使分离组分冲洗出柱，但因所用的冲洗条件过于剧烈而导致被分离组分活性丧失。正因如此，径向色谱柱的填料是完全重新设计合成的。

目前应用于径向色谱柱的填料主要是在多糖类物质，如纤维素、葡聚糖或琼脂糖基质上共聚或接枝而合成的混合填料。这类的填料有较多的优点：(1)　多糖类物质一般都是植物类物质，作为生物大分子的分离材料已有二三十年的历史，对生物样品的吸附作用很低，不影响大分子的活性；(2)　这类物质的分子结构一般都有较多的反应点(如羟基—OH)，易于进行化学反应处理；(3)　目前一般使用的色谱填料是通过酯化、醚化或氧化等方法，直接在多糖类基质上反应、引入必要的官能团而成。尽管可以不破坏基质本身的结构，但所获得的产品与生物样品作用的容量较低，因而色谱柱容量也较小，很难满足现代生物工程中下游大规模处理的需要；(4)　新设计合成的填料是在多糖类基质上通过接枝聚合反应，以化学共价键结合上有机聚合物，形成一部分是具有稳定结构的半刚性部分，另一部分则是较软的聚合物。通过调整两部分的比例可以获得不同容量的填料，同时随着聚合物组份的引入，改善了多糖类物质强度不够高的缺点，可以承受径向色谱柱的流动相高速冲击；(5)　聚合物通过化学共价键联于多糖基质，结合强度较高，聚合度可以根据需要进行方便的调整，从根本上解决了单纯聚合物填料自身的缺陷：低交联度时，孔径较大但强度低，极易溶胀；高交联度时，强度增加不易随溶剂的作用而溶胀，但孔径缩小，不适合于生物大分子的分离。

从已发表的文献来看，径向色谱柱使用的填料主要还是离子交换型和亲和色谱型，这与现在生物样品分离纯化所选用色谱填料的趋势一致。表 13－1 是 J. Bonnerjea 等统计各种色谱技术在蛋白质提纯中的使用率及提纯效率[10]。

从表 13－1 可以看出，在各类色谱技术中，离子交换色谱的使用率最高，而其中又以二乙基胺基乙基纤维素(DEAE－纤维素)使用最多，其次为羟甲基纤维素(CM－纤维素)和磷酸纤

维素(P-纤维素)。提纯倍数以亲和色谱为最高,而其中又以利用免疫沉淀机制的配基及三嗪染料配基的亲和色谱最为多用。

径向色谱柱填料之所以多选用这两种类型,主要因为这两类介质具有高选择性,可用来克服径向色谱柱柱径短的缺陷。具有高选择性的填料,当容量较大时,它制成的径向色谱柱具有速度高、处理量大等优点。

表 13-1 各种色谱技术在蛋白质样品中比较

	使用率, %	平均提纯倍数	最高提纯倍数
离子交换	75	8	60
亲　和	60	600	>1000
凝胶过滤	50	6	120
无机吸附	>33	15	100
疏水作用	>33	20	60

径向色谱柱填料可用以下方法实现:(1) 通过以基质与含有能与生物大分子作用官能团的乙烯基化合物直接进行接枝共聚;(2) 基质与含乙烯基的化合物接枝聚合,再引入官能团而得。13-4 是获得的径向色谱柱填料的物理结构示意图。

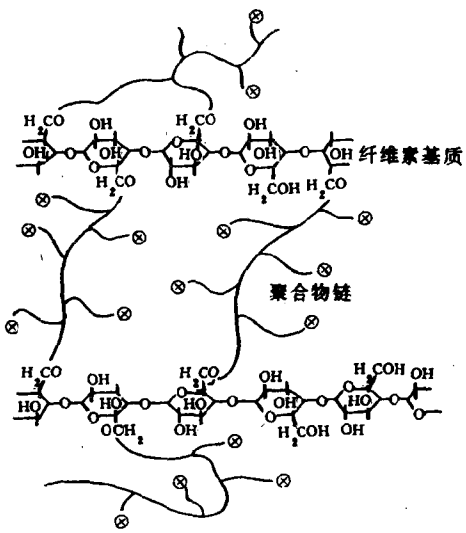


图 13-4 径向色谱填料示意图
⊗ 分离作用活性点,如离子交换基团、亲和配基等

第四节 径向色谱柱的应用

从已发表的文献看,径向色谱柱在生物制剂、血液制品以及基因工程产品等方面已大量使用,其结果是积极的。图 13-5 是不同规格径向色谱柱的线性放大能力示意图,可以看出当径向色谱柱保持柱径不变、只增加柱长时,其处理能力是线性增加的。表 13-2～表 13-4 是径向色谱柱与传统的轴向色谱柱处理能力的比较[9]。从表 13-2 可看出,当柱体积相差不大时,径向柱的流速和班产率高于轴向柱,分别是后者的 3～3.8 和 3 倍。从表 13-3 可看出在生产规

模、流速和斑产相同时，径向柱的体积只需轴向柱的 1/3 左右即可。表 13－4 表明，尽管径向色谱柱比轴向柱体积放大了 5 倍以上，但所获得结果仍优于轴向柱。

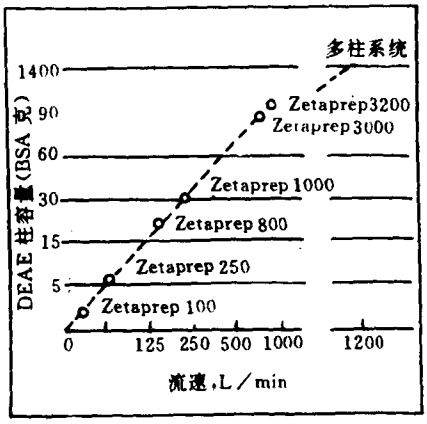


图 13－5　径向色谱柱的线性放大

表 13－2　中试规模径向柱与轴向柱经济性比较

	轴向柱	径向柱
流速	25L/h	75～95L/h
产率	350L/3 班	350L/班
柱尺寸	16L	20L

表 13－3　相同生产规模的径向柱与轴向柱的比较

	轴向柱	径向柱
流速	200L/h	200L/h
产率	1000L/班	1000L/班
柱尺寸	160L	60L

表 13－4　轴向柱与径向柱的抗凝血剂回收率的比较①

	体积 ml	上样流速 ml/min	柱流速 L/h	抽提蛋白量 mg	抽提活性 IU	回收活性 IU	产率 %
轴向柱	75	80	1	760	5.1	2.5	49.0
径向柱	400	120	3	3832	25.8	15.8	61.0

①所装填料为 Histidyl Sepharose。

下面介绍径向色谱柱在生物样品的分离纯化中的应用。

一、血液制品

血液制品的获得不仅在治疗医学（如分级输血）方面，而且在理论上研究某种病因、富集微量物质，都有极大的应用。Kenneth C. Hou 报道了 8L 人血浆的分离制备[11,12]，在数十分钟内可获得纯度为 100%的免疫球蛋白（IgG）、纯度为 85%的转铁蛋白（Transferrin）和 80%的白蛋白（Albumin），如图 13－6。作者曾将 DEAE 和 CM 两种不同离子交换型径向色谱柱串联以

分离人血浆蛋白，上样后将两柱拆开，分别用含盐的流动相冲洗，如图 13－7、图 13－8。CM 柱冲洗下来的 3 个峰收集后，经等电聚焦电泳证实，为具有 3 种不同等电点的免疫球蛋白(IgG)；DEAE 柱冲洗下来的 3 个峰经 SDS－PAGE 扫描后征实为白蛋白(纯度大于 90%)、部分白蛋白(等电点 PI 有变异)和血浆中的其它蛋白(主要是转铁蛋白)。根据白蛋白和 IgG 在血浆中的含量计算蛋白回收率在 70%以上。采用两种不同离子交换官能团的径向色谱柱串联分离人血浆的优点是：柱负荷能力大，利用率高，冲洗简单且快速。

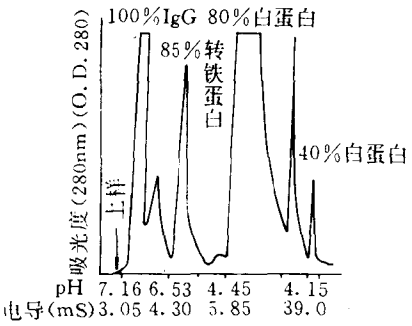


图 13－6　人血浆的大规模分离

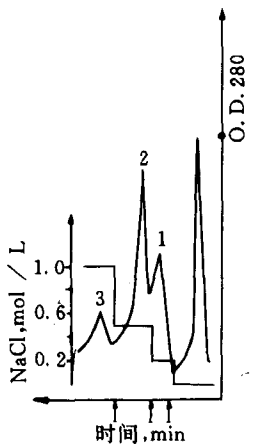


图 13－7　CM 柱分离人血浆

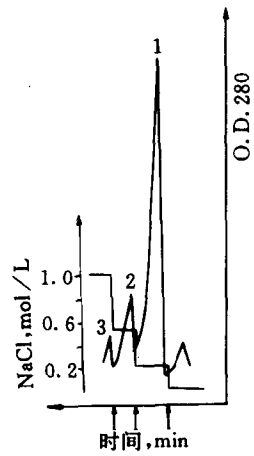


图 13－8　DEAE 柱分离人血浆

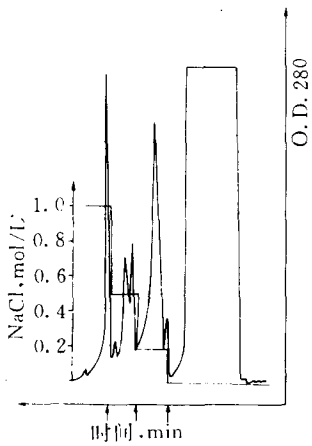


图 13－9　小牛血清分离谱图

图 13－9 是作者利用 CM 柱分离小牛血清的谱图。从图中可看出，小牛血清的主要成份是牛血清白蛋白，其它蛋白如转铁蛋白、血红蛋白含量较少。经 SDS－PAGE 证实，所分离的牛血清白蛋白基本为一纯品，总蛋白回收率大于 90%

对于血浆蛋白这样组成极为复杂的样品，只要选择合适的径向色谱柱，都可以获得满意的结果，并且分离速度快，产品纯度高，负荷量较大，整个过程极为简单，可以原位消毒，完全可替代目前使用的分级沉淀、离心法。

以小牛血清为样品作者还证实了径向色谱柱的线性放大能力。图 13－10 是牛血清上样量增加 6 倍时的分离谱图。可以看出虽然上样量增加了倍数，但只要适当的增加柱长，分离结果几乎完全一样，这样对于从分析到制备过程简化带来了许多便利。如果还需要继续提高制备量，从理论上讲只需增加柱长就可以满足，但一般的实际应用采用相同的径向色谱柱并联来实现。

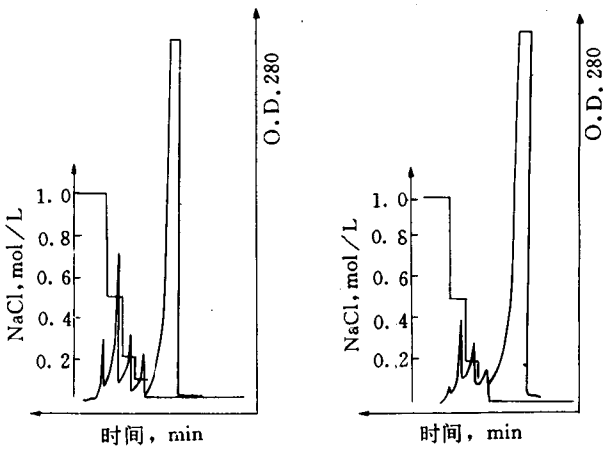


图 13－10　CM 型柱分离小牛血清的放大

二、生物样品

生物样品种类较多，无论是应用还是对其结构、性能的研究都需提高纯度后才能进行。这样的样品往往体积较大，样品纯度低，活性又高，而径向色谱柱正适合于这样的样品分离纯化。事实也是如此，在大规模的分离纯化时，往往以离子交换色谱作为提纯的第一步或第二步，这是因为离子交换的容量高而价格低，并有利于减小样品体积。尽可能早地降低待处理体积，既有利于增加以后分离步骤的选择性，又能降低成本。

图 13－11 是 A. Jungbauer 等用 QAE 型径向色谱柱在 50min 内纯化鼠抗人尿激酶单克隆抗体的情况[13]，纯化的结果是纯度增加了 4 倍，收率为 80%～90%。作者指出，与传统的低压液相色谱相比较，产率提高 10～15%，时间更短，操作容易，使用寿命延长。同时作者还研究了不同浓度柱上容量问题，发现即使样品主要是杂蛋白，纯化过程仍然是方便的，产率也较高。F. D. Menozzi 报道了[14]使用 SP 型径向色谱柱纯化小鼠单克隆抗体，比较了梯度与分步洗脱的情况。结果表明，梯度洗脱收集的无其它杂蛋白的干扰，收率可达 90%左右。

对于纯化牛或人凝血酶，Franck C. Church 等使用 SP 型径向色谱柱也取得了较好结果[15]。分析表明牛凝血酶纯化了 30 倍，酶收率大于 96%；人凝血酶纯度增加 4 倍，收率为

88%。纯化后的牛或人凝血酶经测试分别为 2500 和 3000"NIH"/mg，是目前报道最好的凝血酶。

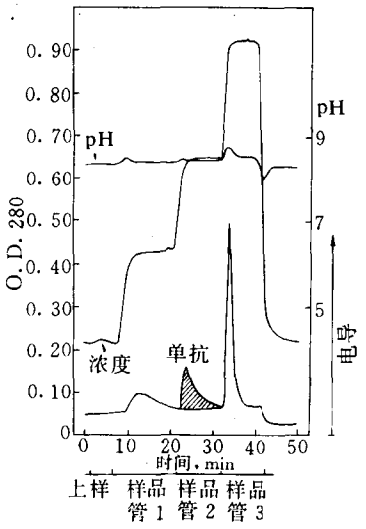


图 13－11　鼠抗人尿激酶单克隆抗体的纯化

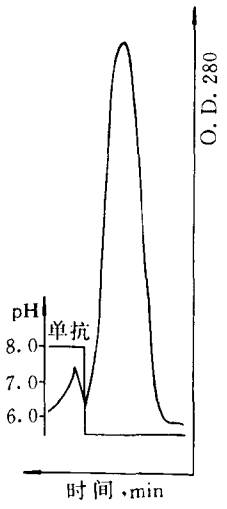


图 13－12　登革病毒单克隆抗体的纯化

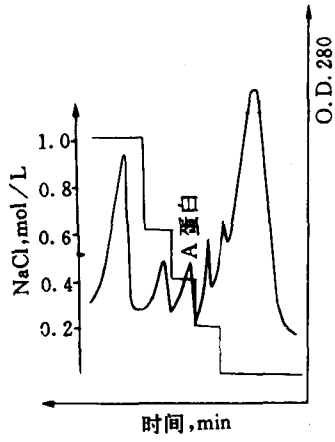


图 13－13　重组 A 蛋白的纯化

作者使用 CM 型径向色谱柱纯化了登革病毒单克隆抗体和乙型肝炎核心抗原单克体。采用改变流动相 pH 值的办法，登革病毒单克隆抗体全部在 pH＝8.0 的洗脱峰中，纯度为 50%。经 ELISA 检测，未吸物中无单克隆抗体。硫酸铵沉淀后纯度可达 90%以上，保存数月活性稳定(图 13－12)。作者采用 DEAE 型径向色谱柱还纯化了重组 A 蛋白(rProtein A)(图 13－13)。纯化后 A 蛋白纯度提高 4～6 倍，回收率达 75%，直接用 Phenyl－Sepharose 疏水柱和 Sephacryl S－200 分子筛柱后，可得电泳纯 A 蛋白。用 DEAE 型径向色谱柱分离葡聚糖水解酶(2－Gase)，与常规 DEAE 纤维素色谱柱比较，相同条件时结果一样，但速度快 2/5(表 13－5)。在分离纯化人红细胞生成素时，可将 10 IU/mg 的初品纯化至 30 IU/mg，得率 70%～

80%。

表 13-5 葡聚糖水解酶纯化的比较

柱 型	SinoChrom RCC DEAE 100A	DEAE 250	DEAE 600	自装 DEAE-C 柱
吸附蛋白质	8～9mg	/	/	14/10g 干粉
一次可分离量	16mg	30～40ml	<100ml	20ml/10g 干粉
使用情况	使用 10～20 次后，流速明显下降	使用 15 次后，流速未出现大的变化	/	使用 5～8 次后，流速下降明显，必需重新装柱才能保证流速
	每分离 1L 发酵液，需 42～152h（一支柱）	每分离 1L 发酵液，需 17～21h（一支柱）	每分离 1L 发酵液，需 8～10h（一支柱）	每分离 1L 发酵液，需： (1) 2.6×20cm 柱（10g 干粉），83h (2) 5.0×80cm 柱（130g 干粉），74h (3) 8.0×48cm 柱（200g 干粉），10h

三、基因工程产品

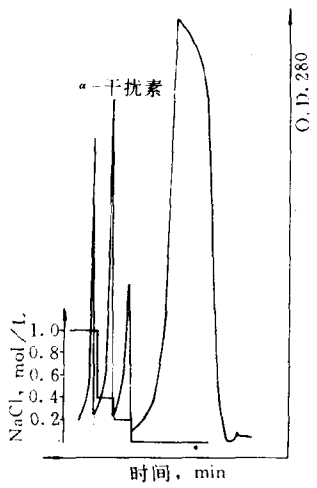


图 13-14 rIL-2 的纯化

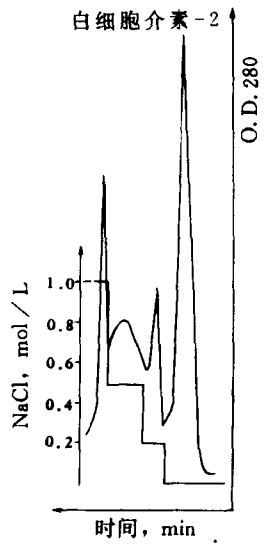


图 13-15 r-IFN 的纯化

径向色谱柱也特别适合基因工程产品的初级分离纯化，M. Yoshinaga 等[16,17]为了除去白细胞介素-1(Interleukin-1，IL-1)，培养上清样品中大量牛血清白蛋白(BSA)，将 DEAE 和 SP 型径向色谱柱串联预平衡后，以 1.8L/h 的流速上样 30.8L，样品中绝大多数 BSA(约 70g)吸附在 DEAE 柱上，而 80%的活性组分都吸附在 SP 柱上，然后将串联柱拆开单独冲洗 SP 柱，大部分活性组分洗出，再经超滤和凝胶色谱柱，最后获得 58%的收率，活性组分活力增加 2400 倍。Yoshikazu Kikumoto 等[18]单独用 SP 型径向色谱柱，再联合其它纯化技术，分离纯化

了从大肠杆菌中生产的重组人白细胞介素-1(Recombinant Human Iuterleukin-1, rIL-1)，2.1L 上清样品上样后，流出组分再经 SP-HPLC 和 GF-HPLC，最后获得 670mg 纯品。经分析，大规模生产的 rIL-1 与自然 IL-1 的生化与生理特性完全相同。M. C. Cassgli 等[19]用 QAE 型径向色谱柱也纯化了 rIL-1，上样流速为 18ml/min，上样量为 300～500ml，收集流出组分，再经 HTP 和 Sephadex G-50 进一步纯化，活力为 1.3×10U/mg。

作者使用 DEAE 型径向色谱柱分别纯化了重组人白细胞介素-2(rIL-2)和 r-干扰素(r-IFN)，见图 13-14、图 13-15。rIL-2 在不吸附峰中流出，纯度提高 2～3 倍。使用 DEAE 径向色谱柱分离纯化 r-干扰素，与传统的轴向柱(填料为 DEAE Sepharose FF)比较，在相同条件时，结果相同，但用径向色谱柱速度提高 2 倍以上。

径向色谱分离技术作为一种新型的色谱分离技术将在生物工程中发挥着重要的作用。但作为一种新技术，它的许多理论和实际问题尚未解决，新型的径向色谱介质尚有待于进一步研究和发展。

参考文献

1 J. L. Dwyer. Biotechnology, 1985, 2, 957

2 姚志建. 色谱. 1985, 5, 277

3 姚志建. 色谱. 1989, 1, 15

4 苏拔贤. 生物化学制备技术. 科学出版社, 1984

5 P. Dunnill. Process Biochem., 1983, 18, 9

6 S. Berkowitz, et al. Biotechnology, 1987, 5, 611

7 Plnela Knight. Biotechnology, 1987, 8, 777

8 G. McGregor. Biotechnology, 1989, 4, 526

9 Vinit Saxena, et al. Biotechnology, 1989, 3, 250

10 J. Bonnerjea, et al. Biotechnology, 1986, 4, 954

11 Kenneth C. Hou, et al. Biotechniques, 1986, 4(4): 358

12 Kenneth C. Hou, et al. J. Chromatogr., 1986, 207

13 A. Jungbauer, et al. Recovery of Bioproducts, Uppsala, May, 11(1986)

14 F. D. Menozzi, et al. J. Immun. Meth., 1987, 99, 229

15 Frank C. Church, et al. Anal., Biochem., 1986, 157, 77

16 Marau Yoshinaga, et al. 6th Int. Congr. Immun., Toronto, Oct., 1986

17 Marau Yoshinaga, et al. Interleukin Symposium, Ann Abor, March, June, 1985

18 Yoshikazu Kikumoto, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1987, 147(1): 315

19 M. C. Cassagli, et al. Prep. Biochem., 1989, 19(1): 23

20 Kenneth C. Hou, et al. Appl. Biochem., 1991, 13, 257

21 P. Yasmine, et al. J. Chromatogr., 1991, 539, 531

22 Y. Yazuya, et al. J. Biochem., 1991, 109, 404

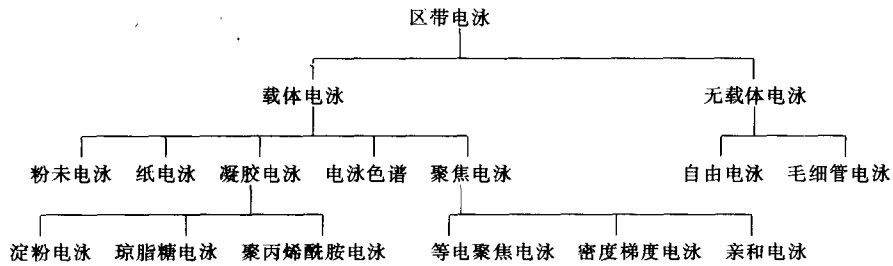
第十四章　电泳分离技术

孙万儒

（中国科学院微生物研究所，北京，100080）

第一节　概　述

早在19世纪初就已发现，带有不同电荷的质点在电场作用下向不同电极方向迁移，并称该现象为电泳，直到本世纪40年代才开始用于分析目的。经近半个多世纪的发展，特别是电泳技术原理的不断扩展，电泳仪器和检测手段不断完善，使之成为实验室中强有力的分析、鉴定和分离技术，并从实验室应用逐渐扩大到更大规模的制备应用。近几年各种电泳仪器设备的发展虽然落后于色谱仪器设备，但在实验室内用于分析的各种电泳技术的可靠性、分辨率、使用的难易度和成本均可与HPLC相竞争，而在大规模应用上，电泳在分辨率和容量等方面还难于和制备型HPLC竞争。从电泳技术发展趋势看，在未来几年内有可能达到制备型HPLC的水平。近20年来随着生物技术的发展，电泳技术在生物技术研究和生物技术产品的检测、鉴定、分析、分离上的应用受到高度重视。将电泳原理与其它技术原理相结合，发展了许多新的电泳技术。在生物技术研究和生物技术产物分离上广泛应用的电泳主要是区带电泳。依据分离原理和使用的电泳载体，区带电泳可分为以下多种电泳技术。



本章主要介绍可较大规模应用的电泳分离技术。

第二节　电泳技术原理

生物技术研究的主要对象和生物技术产物主要是核酸和蛋白质。蛋白质分子是含有可带正电荷的氨基、亚氨基、酰胺基等和可带负电荷的羧基、苯酚基、巯基等的两性生物大分子。这些基团所带电荷的性质和数量完全随溶液环境（如pH值和离子强度等）变化。带有正电荷的

蛋白质分子在电场作用下向阴极方向移动；而带负电荷的蛋白质分子向阳极方向移动。蛋白质分子在电场内迁移所受到的力(F)与电场强度(E)和蛋白质分子的净电荷数(Z)成正比关系。

$$F=E\cdot Z \tag{14—1}$$

蛋白质分子在电场中受的力也与溶液粘度(η)、分子半径(r)及稳态下移动速度(v)有以下关系。

$$F=6\pi\eta rv \tag{14—2}$$

如果以迁移速率 $u=v/E$ 来表示，则：

$$u=\frac{Z}{6\pi\eta r} \tag{14—3}$$

(14—3)式表明各种不同分子量的蛋白质在电场内的迁移速率(u)只与它的净电荷数(Z)成正比，而与它的分子(球状分子)的半径及溶液的粘度(η)成反比。溶液中，特别是在低离子强度溶液中，带不同电荷的蛋白质分子之间有时会发生相互之间的静电作用，形成更大的分子团，影响它们在电场中的迁移速率。增加溶液的离子强度，可以减少不同蛋白质分子之间的相互作用。但会提高电泳电流，进而使电泳过程产生更多热量，使电泳温度升高。温度升高又会促进蛋白质分子扩散，使电泳区带变宽，降低电泳分辨率。因此，电泳使用的缓冲液的 pH 值、缓冲剂的类型、浓度以及样品中的盐浓度均需要仔细选择，须在减少盐浓度、降低电泳产热和增加盐浓度、降低不同蛋白质分子相互作用之间进行折衷选择。在实验室和某些制备用电泳技术中，凝胶电泳使用的最广泛、最常用、最成功的载体是琼脂糖和聚丙烯酰胺。其中尤以聚丙烯酰胺凝胶应用更广，因为它具有三维网状结构，可形成大小不同的孔隙，因而具有很强的分子筛作用。也就是说凝胶载体对不同蛋白质的有效粘滞度取决于蛋白质分子大小。实验证明，“在分子筛范围”内蛋白质的电泳迁移速率(u)与蛋白质的分子量的对数成线性关系，如图 14－1。这种关系可用(4)式表示。

$$u=u_0(A-\log M)/A \tag{14—4}$$

式中，A 为将直线外推到在凝胶中不再迁移时的蛋白质分子量的对数值，即最小排阻分子量的对数值；M 为蛋白质分子量；u_0 为不受凝胶影响的小分子物质迁移速率，即：

$$u_0=\frac{Z}{6\pi\eta r_m} \tag{14—5}$$

而 r_m 为不受凝胶排阻影响的小分子的最大直径。因此(14—4)式可表示为：

$$u=\frac{Z}{6\pi\eta r_m}\cdot\frac{A-\log M}{A} \tag{14—6}$$

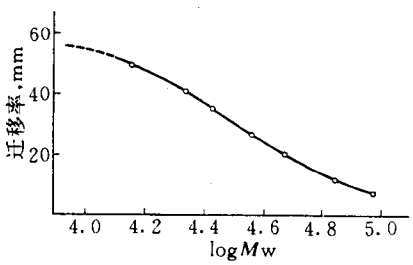


图 14－1　具有相同电荷密度的近球型分子的蛋白质电泳迁移速率与其分子量关系

(6)式说明凝胶电泳是按物质的电荷多少和分子大小进行分离的。凝胶可以依据要分离物质的分子大小设计出适当大小的孔径，这只要控制凝胶的交联度就可以做到。使用凝胶的好处

是它可以减小蛋白质的扩散和液体对流的影响，得到狭窄的分离区带，使具有相同电荷、不同分子量的蛋白质有很好的分辨率。

第三节　电泳的技术问题和对策

电泳技术的使用目的是将混合物中的各个组分实现分离，有效的措施是增大各组分的电泳迁移速率的差异。从式(14—6)可以看出影响迁移速度的有 3 个因素： a)各组分的分子净电荷数； b)分子量； c)电泳系统介质的有效粘滞度($A\eta/A\text{-}\log M$)。而这 3 个因素又受控于电泳时的条件。

(1)　由于蛋白质分子所带的净电荷主要取决电泳缓冲液的 pH 值，因此应仔细调整和控制电泳缓冲液的 pH 值，尽可能使各组分分子的净电荷数的差异加大，但因蛋白质在酸或碱性条件下易变性失活，因此一般控制在 pH4.5～9.5 的范围内。

(2)　选择适当的缓冲系统，包括缓冲剂种类、浓度和其它电解质浓度。因为不同种类的缓冲剂与蛋白质之间的作用差别较大，同一种蛋白质在不同缓冲液中，既使 pH 值相同，蛋白质所带电荷也可能不同，也影响不同蛋白质分子间的相互作用。缓冲剂和其它电解质的浓度对蛋白质分子的净电荷及分子间的相互作用的影响也十分显著。

(3)　表面活性剂(如 SDS)会强烈地破坏蛋白质分子间的非共价键作用，使蛋白质分子为表面活性剂分子包围，阻止了蛋白质分子间的相互作用，同时也消除了不同蛋白质分子的固有电荷差异。

(4)　控制电泳系统介质的有效粘滞度($A\eta/A\text{-}\log M$)，这包括选择适当的凝胶孔径和添加适当浓度的能增加介质粘度的物质(一般用蔗糖)，这在无载体电泳中就更加重要。

电泳过程中产热使温度升高会造成以下后果： a)蛋白质变性，使分离失去意义。这在分析型电泳上似乎不十分重要，但在制备型电泳上是至关重要的； b)温度升高会引起对流，蛋白质区带扩散，降低分辨率。随着电泳规模的扩大，产热越多，热量的去除越困难。电泳产热是电泳技术扩大规模的主要障碍。电泳过程中因有电流(I)和电压(E)的存在就会产生热量(W)。

$$W=IE \tag{14—7}$$

按 Ohm 定律产生的热量与电流(I)和系统的电导率(K)有以下关系。

$$W=I^2/K \tag{14—8}$$

即产生的热量与电流的平方成正比，与系统的电导率成反比。因此，从(14—7)和(14—8)二式可以得出结论，在电泳过程中降低电流和降低电压均可以达到降低产热的目的。但(14—1)式表明电泳迁移速率只与电压有关，因此在电泳中均采用降低电流、提高电压的方法，从(14—8)式看降低电流对降低产热更有效。为保证电泳的低电流，使用的缓冲液必须是低离子浓度，但低离子浓度的缓冲系统的电导率(K)也低，使产热增加。而且低离子浓度会增加蛋白质分子间的相互作用，因此缓冲液的离子浓度选择要兼顾三方面的影响。

在一个绝热、不流动系统中，温度的升高(ΔT)与时间(t)、电流(I)、电压(E)介质的比热容量(C_P)、密度(ρ)和体积(V)有以下关系：

$$\Delta T=\frac{IE}{C_P\rho V}t \tag{14—9}$$

(9)式说明，在无冷却条件下的电泳系统除控制电流和电压外，增加缓冲液体积、热容量或密度均可以控制温度升高。但实际上这是一种被动的方法，因这些因素的控制是有限的，往往因其它因素的影响而不能采用。最常采用而又有效的方法是对电泳系统进行冷却，将电泳产生的热量从电泳系统中移出，保持电泳温度恒定。影响冷却效果的有以下三大因素。

(1) 冷却面积，即热传递面积。在允许的范围内尽可能增加冷却面积，如采用毛细管或薄层或圆桶状电泳，但增大单位体积的表面时会增加在界面上的电渗，降低分辨率。

(2) 热传递系数。在设计和制造电泳系统和冷却系统时要认真考虑材质的热传递性能，高的热传递性能的材料对冷却是有利的，但作为电泳系统的材料还要考虑它对电泳性能的影响。

(3) 热传递的推动力——温差。两个系统的温差越大，热传递的速率越大。采用低温冷却是有效的。冷却系统的冷却液流动速度是控制冷却效果的重要因素，通过冷却液的流动速度控制即可以达到控制电泳温度的目的。

在有冷却系统的电泳设备中，影响电泳效果的两个重要的无量纲数为 Rayleigh 数(Ra)和 Grashof 数(Gr)：

$$Ra = \frac{g\beta\Delta T d_c^3 \bar{\rho} C_p}{k_t \eta} \tag{14—10}$$

$$Gr = \frac{g\beta\Delta T d_c^3 \bar{\rho}}{\eta} \tag{14—11}$$

式中，g 为重力加速度；β 为热扩散系数；$\bar{\rho}$ 为流体的平均密度；d_c 为扩散层厚度；η 为粘度；k_t 为热导率。在电泳中，Ra 和 Gr 值越小，说明电泳效果和分辨率越好。从(14—10)和(14—11)式看，可以采取以下措施。

(1) 增加缓冲系统粘度或增加电泳介质的粘滞度均可以减少扩散和对流。

(2) 减小热扩散层厚度 d_c，包括增加冷却系统的冷却液流速和减小冷却系统与电泳系统中间的隔离物厚度。

(3) 在微重力条件下进行电泳，即减小重力加速度 g 的影响，这需在航天器上进行，但成本太高，也可采用旋转系统。

而一旦电泳和冷却系统设计完成、使用的材质已确定时，热扩散系数 β 和热导率 k_t 及流体平均密度 $\bar{\rho}$ 均已成定值，只有在设计电泳仪时必须对此加以充分考虑。

为了增加冷却效果而提高电泳系统的表面积的方法也是有一定限度的。增加电泳凝胶表面积会引起电泳过程中的电渗传递。电渗是沿着固定界面产生的流动和压力梯度，其方向往往与电泳方向相反，在截面上产生混合，电渗使电泳区带边沿不齐整，使分辨率降低。电泳中的电渗现象较容易解决。使用适当的涂层剂在电泳设备的固定界面上进行处理，使之不再吸附在固定界面上容易吸附的离子，即可消除电渗。

以上各种因素主要是对电泳本身的分辨率有影响。对用于不同目的电泳分辨率的影响还有其它因素。比如用于分析目的电泳，电泳之后的显色技术也是十分重要的。显色方法不灵敏、蛋白质含量极微的区带不能显色，使电泳的分辨率降低。对于目的是回收所需产物的制备型电泳，如果电泳时虽然产物区带与杂质的区带分离的很好，但彼此之间靠的很近，那么回收技术的精确度就十分重要了。对于连续电泳，分流的精度和部分收集时的体积或时间间隔的选择也十分重要。必须通过设备设计和实验精确制定。

第四节　在生物技术研究上应用的电泳技术

在生物技术研究(如遗传工程、蛋白质工程、细胞融合、细胞培养、酶工程的研究)过程中，经常要分析、分离、鉴定、检测两大类物质——核酸和蛋白质，它们都是具有生物活性的大分子，需要使用电泳技术。由于电泳具有灵敏度高，重复性好，测定范围宽，适用性好，操作容易，结果直观，设备简单，且兼备分析、鉴定、分离等特点，已成为生物技术研究的重要手段之一。

目前在生物技术研究中使用最广泛有效的是平板电泳，包括琼脂糖凝胶平板电泳、聚丙烯酰胺凝胶平板电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶平板电泳，另外还有聚丙烯酰胺凝胶浓度梯度电泳、聚丙烯酰胺凝胶 pH 梯度电泳以及各种亲和电泳。这些电泳虽具有以上优点，但主要适合定性分析，而进行定量分析时比较复杂。近几年毛细管电泳技术的发展很快，在生物技术研究中的前景十分乐观，它不仅可进行定性分析，也可进行定量分析。

近年来分析型电泳技术的发展主要有以下方面。

1. 新的电泳载体

最早使用的淀粉胶、纸、纤维素及纤维素衍生物等电泳载体已为最近发展的琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶所替代，并广泛应用于各种电泳技术中。特别是聚丙烯酰胺凝胶由于制备简便，稳定性好，机械强度高，流体力学和电动力学性质优越，吸附性低，干扰小，适合与其它方法和材料匹配而广泛应用于各类电泳技术中，并大大改进了各种电泳技术性能。

2. 显色技术

电泳显色技术最早是直接观察有色物质或因吸收紫外光而呈现暗色的斑点的特点进行电泳结果观察。到 60 年代发展了用有机显色剂的方法，从较早的氨基黑到考玛斯亮蓝，直到近年的银显色技术，使显色的灵敏度提高了 100 倍以上，达到毫微克水平。另外还发展了荧光标记和放射标记技术，为极微量生物技术产物的检测和微量电泳的发展奠定了基础。

3. 电泳仪及相关设备和材料

近十几年各种分析型电泳仪及辅助设备和材料、电泳载体的发展十分迅速，形成了一个花样不断翻新、产品不断更新的商业化市场，可供使用者选购。设备性能和材料的齐备几乎尽善尽美。因此电泳技术的应用十分方便，且可获得满意的结果，保证了生物技术研究顺利进行。分析型电泳技术在一般的生化技术专著中均有详细介绍，此处不再赘述。

第五节　生物技术产品分离纯化上应用的电泳技术

利用电泳技术在实验室内进行小量生物产物的制备及鉴定检测、分离纯化已相当普遍，随着生物技术的发展，特别是生物技术实用化、商品化的发展，对生物技术产品的分离纯化技术提出了更高要求。由于电泳技术的特点，将其应用于生物技术产品的大规模分离纯化是人们追求的目标。但有希望应用于大规模的生物技术产品的分离纯化的电泳技术的发展却是近些年的事。到目前为止，大规模电泳技术仍处于发展阶段，真正在工业上应用恐怕还需要一定时间。这里只对发展较快又有应用前景的几种电泳分离技术作简单介绍。

一、平板电泳

目前实验室内用于分析检测的平板电泳也可以用于小量样品制备。其种类很多，依据使用

的载体性质和特点，可大致分为两类：一类为一般平板电泳，如淀粉凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳，使用的载体均为惰性材料，只起支持作用，而无分离作用。这类平板电泳既可以用于鉴定和检测，也可用于小量样品制备。另一类为特殊平板电泳，如等电聚焦平板电泳、pH 梯度平板电泳、凝胶密度梯度平板电泳及各种亲和电泳，其使用的载体不仅仅为支持物，更重要的是起分离作用，它们主要用于鉴定和检测，有时也可用于小量样品制备。这两类平板电泳只适于批式操作，难于连续操作。即使扩大平板面积，其处理量也有限，一般为微克级，可扩大到毫克级。

平板电泳操作时有水平平板电泳和垂直平板电泳两种方式。

1. 水平平板电泳

根据使用的载体特点制备电泳平板。使用凝胶型载体时，比如用琼脂或琼脂糖，按所需凝胶浓度用电泳缓冲液与载体混合加热溶解后在玻璃载片上铺成薄层，凝固后即可使用。若用聚丙烯酰胺凝胶作载体，按所需凝胶浓度和交联度将丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺等混合，于玻璃载板上进行聚合形成凝胶平板。将制备好的凝胶平板置于冷却槽或冷却系统之上。在凝胶板两端加上用电极液湿润的滤纸条或泡沫塑料条，其位置要正对准电泳仪上盖上的电极位置。将用于加样的滤纸条放在凝胶平板的适当位置上，然后将欲分离的样品均匀地加在上样滤纸条上，盖好电泳仪盖，接通电源，调整电压，进行电泳。其操作均与分析型电泳相同。电泳结束，切下一小条凝胶，显色后，按区带位置，将所需的组份区带从整体凝胶板上切下，然后用适当缓冲液提取，获得所需产物。也可用两个电极槽放在平板两端，中间用湿的纱布、滤纸或其它材料将电极槽与平板相联结，其它操作与上述过程相同。

如果使用粉末或微球状载体(比如淀粉粉末、纤维素粉和 Sephadex 等)，首先用适量的电泳缓冲液与载体混合制成糊状物，将其倾在平板电泳槽内，制成平板，排出过量的缓冲液。将制成的平板与冷却系统相连接，将平板与两端电极槽用湿润的纱布或其它材料连结。用小刮刀在平板堆中间开出一个小槽，将使用的载体与预先用缓冲液平衡好的欲分离样品混合成糊状物，小心地填入开出的小槽内，接通电流，进行电泳。电泳结束后，将所需的区带刮出，用少量缓冲液洗脱所需产物。由于区带分割时盲目性较大，完全依靠经验，分离的效果并不理想，改进的办法是采用等电点电泳法。

等电点电泳法与等电聚焦电泳不同，在已知所需蛋白质的等电点情况下，使用 pH 值与所需蛋白质等电点相同的电泳缓冲液，与分离样品和电泳载体混合，填入样品槽。电泳时，所需的蛋白质保留在加样处，其它组份根据带电荷性质分别向两个电极方向移动，可以达到很好的分离效果，而且产品回收容易、准确，并且可以多次加样达到较高浓度。另外平板可反复使用。此法也有缺点，对于在等电点条件下容易发生沉淀和凝聚的蛋白质不适用。

在采用等电点电泳分离之前，需要测定所需蛋白质不移动的缓冲液 pH 值。这个 pH 值与用等电聚焦法测定的蛋白质等电点有所不同，因为等电点与使用的缓冲剂类型有关。缓冲液的离子会与蛋白质分子结合，比如磷酸盐或柠檬酸盐均会与蛋白质结合而使蛋白质的等电点改变。用等电聚焦测定的等电点相当于缓冲液浓度为零时的值，即无离子结合情况下的等电点值。

在使用固体载体的平板电泳中，影响迁移速率和分辨率的因素之一是电渗。电泳槽表面和使用的固体载体表面往往带有固定的带电荷基团，而与之配伍的带相反电荷的离子在水溶液中，它们与水分子相结合。在电场作用下，固定的电荷不会移动，但溶液中的离子迁移也携带着

结合水迁移，形成溶液流动。当载体为琼脂或淀粉时电渗作用较大，因它们带有负电荷，会形成向阴极方向流动的电渗流。使用纯化的载体（如琼脂糖）可减少固定电荷、减小电渗，但不能消除电渗。如果加入少量的与之带有相反电荷的材料（如 DEAE—Sephadex）可以中和这种电渗作用。

2. 垂直平板电泳

垂直平板电泳在操作时，为避免电泳载体表面与电极缓冲液直接接触造成分离组份扩散损失，往往采取夹芯平板方式，即在两个玻璃平板之间填入电泳载体，两边封闭，上下端开放，载体上下表面与电极缓冲液接触。样品加在载体上表面之后，在上样槽内加满电极缓冲液，将平板垂直放入下电极槽内的缓冲液中，平板上端安装好上电极槽，小心加入电极缓冲液，即可通电进行电泳。为判断电泳进行程度，可在样品中加入电泳示踪颜料，最常使用的是大分子的蓝色葡聚糖。若使用聚丙烯酰胺凝胶作电泳载体，在分离胶上面还可再加一层交联度低、孔隙大的间隔胶或样品胶，其作用是将加入的样品聚集浓缩，使区带更齐整。当指示用的蓝色葡聚糖达到平板下端时，电泳结束。打开平板盒，切取一条载体用显色法或紫外光检测法，找出目的蛋白质区带。与原平板对照，切出目的区带，用少量缓冲液浸提，或用单一缓冲液电泳法提取，即可得到纯化的目的蛋白质。这样的制备电泳为毫克级。

为扩大平板电泳的制备量，可用增大平板的宽度来扩大平板面积以达到目的。增加平板长度效果不大，因为长度只与分离效果有关。而增加平板厚度也是有限的，因为厚度增加会降低冷却效果，使电泳时载体温度增高，降低分离效果。一般来说，在冷却系统很有效的情况下，凝胶厚度不超过 18mm。

制备型平板电泳的上样量与起始材料即样品中的杂蛋白和目的蛋白质的含量、分离目标（产物纯度）、杂蛋白与目的蛋白质区带分布情况、电泳分离类型、载体（如凝胶）截面积等因素有关。通常分析电泳上样是按样品中的总蛋白质量计算的，而制备电泳上样量可以目的蛋白质量为主考虑。如果目的蛋白质在样品中含量比例很低，且目的蛋白质区带与杂蛋白质区带相邻近，分离目的区带十分困难，最好进行预分离，除去大部分杂质蛋白，才可提高制备量和获得高纯度产物，否则上样量需按总蛋白质量考虑。制备电泳中，聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）的上样量为 0.1mg 蛋白质/cm，等电聚焦电泳（IEF）为 1.0mg 蛋白质/cm，多相缓冲电泳（MBE）为 10mg 蛋白质/cm，由此也可以看出上样量与凝胶表面积成正比。

制备型平板电泳的技术操作可参考分析电泳。

二、连续凝胶电泳

连续凝胶电泳实质上是垂直的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳的发展，实现了在批次内连续将各个电泳区带分离回收，并可进行多批次分离操作。在设备上有以下几个方面的改进。

（1） 聚丙烯酰胺凝胶平板改为薄的圆桶状，使设备体积变小。

（2） 在电场作用下，电泳形成的区带依次连续走出凝胶并进行洗脱、收集，达到将各组份分离回收的目的。

（3） 特殊结构的洗脱腔保证洗脱的区带不相混合，分离的分辨率高。

由 Bio－Rad 开发的连续洗脱电泳仪（如图 14－2）有以下特点。

（1） 可进行聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE），也可进行 SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS－PAGE）。

（2） 上样量为 100ng～50mg 总蛋白质。

(3) 可连续收集分离的蛋白质。

(4) 上样简单仅需几分钟。

(5) 电泳分离时间 4～8h。

(6) 少到占总蛋白质的 2%的不同分子量的蛋白质均可纯化为单一区带。

(7) 可与紫外检测和部分收集器连接。

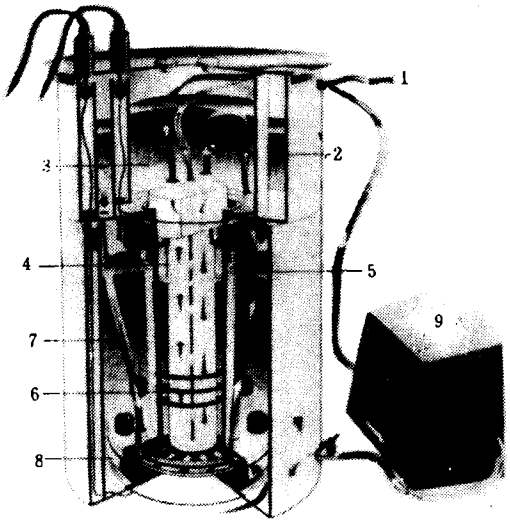


图 14－2 连续洗脱电泳仪结构示意图

1—分离的组分； 2—洗脱缓冲液； 3—上层电泳缓冲液； 4—冷却夹套； 5—凝胶管； 6—蛋白质区带； 7—下层电泳缓冲液； 8—洗脱腔； 9—洗脱缓冲液蠕动泵

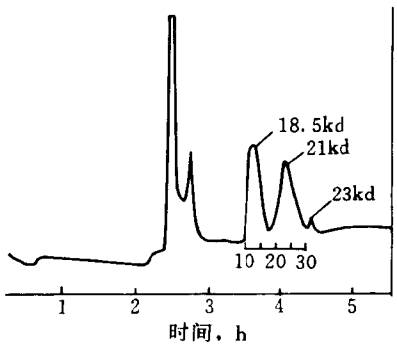


图 14－3 含有 3 个不同亚基的藻青蛋白的 SDS－PAGE 连续洗脱电泳分离结果

连续洗脱电泳分离蛋白质时，最好进行预纯化，达到一定纯度后再进行电泳分离的效果更令人满意。如藻青蛋白(phycocyanin)的粗提取物经等电聚焦纯化后进行 SDS－PAGE 连续洗脱电泳分离，可将杂蛋白与分子量分别为 18.5kD～21kD 和 23kD 的亚基分离，结果如图 14－3。

三、等电聚焦电泳

含多氨基多羧基的一系列聚合物混合形成的两性电解质在电场作用下能形成一个从阳极到阴极 pH 值逐渐增加的 pH 梯度。当不同的蛋白质处于这种环境中时，处于比其等电点低的 pH 环境中的蛋白质会带正电荷，向阴极方向移动；处于高于其等电点的 pH 环境的蛋白质会带负电荷，而向阳极方向移动。在移动过程中随环境 pH 改变，到达与其等电点相同的 pH 环境中，其所带电荷数为零，在电场中不再移动而集聚成区带，从而达到使不同蛋白质分离的目的。根据这一原理发展了管式等电聚焦电泳和平板等电聚焦电泳，两者主要用于实验室内进行分

析检测，也可用于小量样品制备。前者制备量较大，其仪器结构如图 14－4。

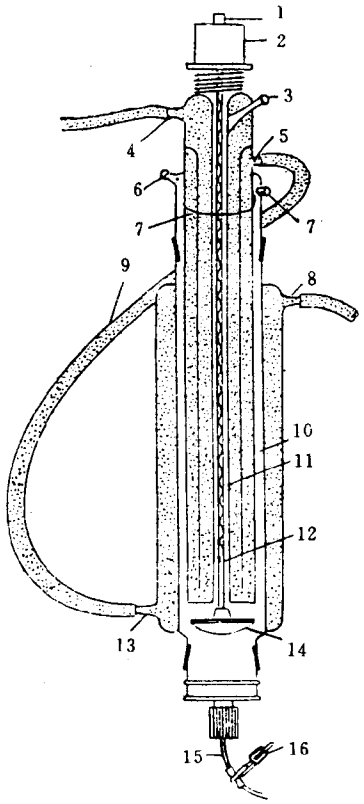


图 14－4　等电聚焦电泳柱结构示意图

1—中心管电极；　2—中心管电极外套；　3—中心电极管溶液入口；　4—内层冷却水入口；　5—内层冷却水出口；　6—加样口；　7—上部电极；　8—外层冷却水出口；　9—内外层冷却水连通口；　10—样品层；　11—中心电极管；　12—中心管电极；　13—外层冷却水入口；　14—中心管电极活塞；　15—样品排出口；　16—样品排出口螺旋夹

在柱式等电聚焦电泳时，为了保持形成的 pH 梯度，防止对流和分离的区带混合，在电泳柱内要制备密度梯度，通常使用蔗糖、甘油、聚乙二醇、甘露醇、右旋糖酐和聚蔗糖等作材料。由两性电解质、样品和蔗糖等制备的重液与不含蔗糖的两性电解质和样品组成的轻液，通过梯度混合器加入电泳柱内，形成下重上轻的密度梯度。pH 梯度范围可根据需要，选择两性电解质。电泳时需冷却。电泳过程中电流逐渐下降，到稳定时，电泳结束。关掉电源，从柱下端小心、缓慢地放出电泳液，根据需要收集流出液，每管收集量应适当，过大时分辨率降低。通过测定每个收集的部分，可以将不同组份分离。也可在放出过程中用紫外检测。

柱式等电聚焦电泳仪器和操作比较复杂，电泳液排出时的流速、收集部分的体积、检测方法及其意外因素均会影响分辨率。针对以上问题可以作以下改进。

1. 螺旋管等电聚焦电泳

将分离样品与两性电解质混合，装入一个长的挠性管内，并将它缠绕在圆柱上成纵螺旋。管两端放入电极槽中，通电进行电泳。结束后，直接将管分割成段，倾出管内电泳液，即可达到分离目的。其过程如图 14－5 所示。

这种方法可以不使用密度梯度办法稳定 pH 梯度，易冷却控制电泳温度，操作简便，分辨率高，但制备量小。

2. 水平旋转等电聚焦电泳

该电泳仪(图 14－6)是由 Bio－Rad 制造出售的商品，它针对垂直柱式等电聚焦电泳存在的主要问题，诸如结构复杂、需加密度梯度稳定 pH 梯度、需控制热引起的扩散和对流以及放

样时的各种干扰因素，在设计上采取了以下措施。

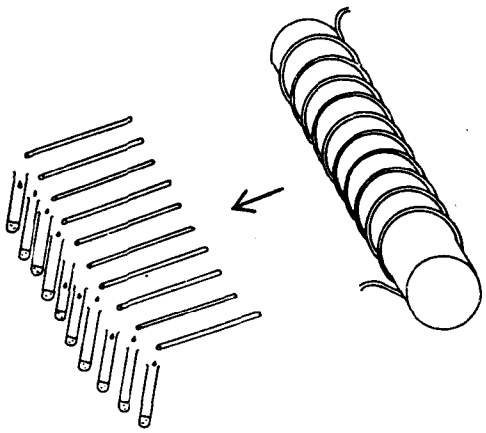


图 14－5　螺旋管等电聚焦电泳示意图

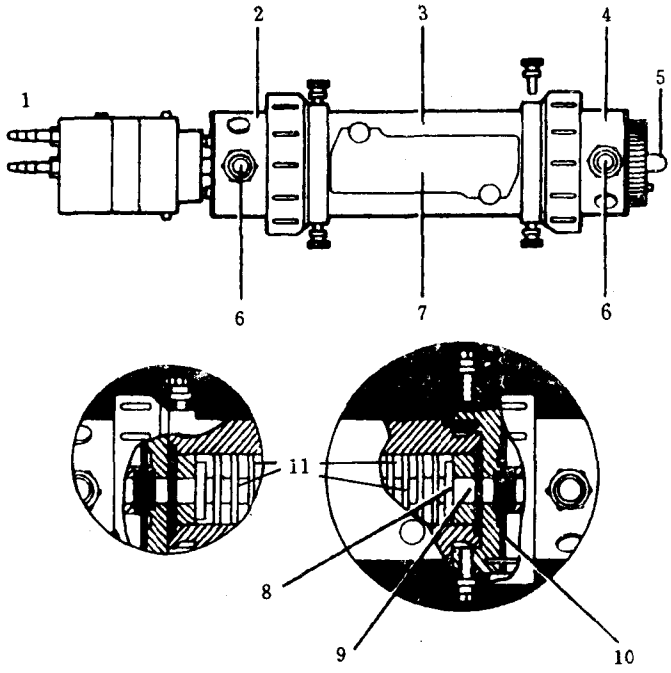


图 14－6　水平旋转等电聚焦电泳仪

1—冷却液出入口；　2－ 阳极室；　3－聚焦室；　4—阴极室；　5—冷却凸齿；　6—出口密封塞；
7--取样口盖；　8—膜芯；　9—冷却凸齿；　10—离子交换膜；　11--聚酯隔膜

（1）　将电泳柱横放。为避免对流，用 19 个平行多孔（孔径为 10 μm）的聚酯膜将柱分为 20 个间隔部分，膜对蛋白质的迁移无碍障。

（2）　电泳柱绕中心轴旋转，有助于克服重力和热对流对聚焦区带的影响。

（3）　电极室与电泳室直对，电场均匀，用离子交换膜将电极室与电泳室隔开，并可防止

酸、碱电极液对蛋白质及电泳液的干扰，也可以防止电极电解产气对电泳的影响。

(4) 电泳结束，可用真空多头取样装置一次快速将每个隔离室内聚焦好的样品取出，防止区带混合。

(5) 柱内有冷却系统。

该等电聚焦电泳仪操作简便，聚焦室容量为 55ml，可上样品溶液 30～50ml，总上样蛋白质量可达 3g，聚焦时间约 4h。一次分离后，若分辨率低，可将其再次进行电泳，甚至反复进行，可达到较高的纯化倍数。由于电泳室分隔较少，一次电泳的分辨率受其影响不会高，需重复多次电泳，但作为一种分离技术还是比较有效的。

等电聚焦电泳也有其自身的缺点：

(1) 在等电点时有些蛋白质不稳定或发生沉淀变性；

(2) 两性电解质对某些测定方法有干扰，为得纯净的目的产物需除去两性电解质，增加了纯化步骤；

(3) 两性电解质比较贵，因此等电聚焦电泳分离技术成本高，妨碍了它的应用。

四、连续流动电泳

最早使用的连续流动电泳是在纸电泳的基础上发展起来的。以滤纸为载体，可以减少分离组分在流动的缓冲液中的自由扩散。将滤纸的上端插入电泳液槽中，依靠毛细管虹吸作用和重力作用，电泳缓冲液沿着滤纸面向下均匀流动，在垂直于电泳缓冲液流动方向上施加电场，即在滤纸的两个侧边上与电极接触，将欲分离的样品以定点方式流加在滤纸上，加样点的位置需根据各组份的电泳行为确定。在电场作用下带有不同电荷的组份随着电泳缓冲液向前流动的同时向不同电极方向迁移，在滤纸表面上形成不同的抛物线状的迁移轨迹。在滤纸的末端剪成锯齿状，分别接收流出的各个组分，达到将不同组分分离的目的，其设备和原理如图 14－7 所示。

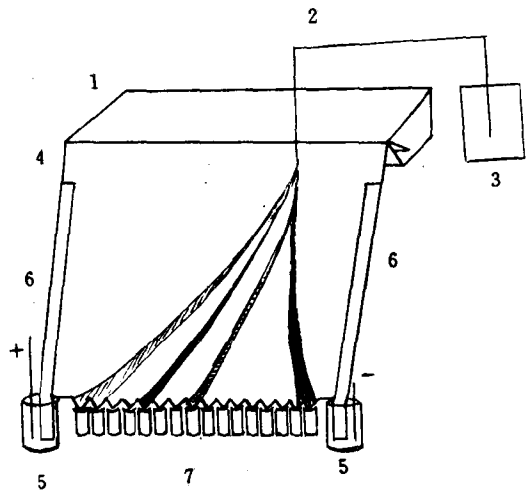


图 14－7 连续流动电泳的工作原理及设备示意图

1—电泳缓冲液槽； 2—加样管； 3—样品槽；4—滤纸载体； 5—电极槽； 6—电极条； 7—收集管

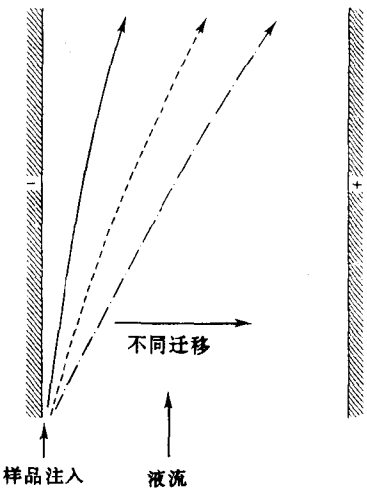


图 14－8 连续流动电泳原理示意图

这种电泳的分离效果主要与各组分的迁移速率的差异、电泳缓冲液流动速度、液流分割的级数、电场强度、滤纸载体长度等诸多因素有关。在电泳过程中必须严格控制缓冲液流速和加样的速度，两者必须协调才能保证电泳连续正常工作。从理论上讲，液流分割级数越多分辨率越高，但因下端长度有限，因而为了接收各个部分，分割级数不可能很高。因分割级数不可能很高，对于组分复杂的混合物的分离效果又会降低。若采用定位接收是理想的，但实际操作上有困难。另外，严格控制电压、缓冲液流速流量、加样量及冷却系统等各因素也有一定困难。

近些年，在连续流动纸电泳的基础上，在电泳载体、设备结构和控制手段上有了较大的发展，采用微球状的 Sephadex、Sepharose、Sephacel、Sephacry 和纤维素粉等载体制备夹芯平板状的电泳床，使用精密的电子控制系统，保证了各种因素的最佳实施，使这种类型电泳有了较大发展。

五、无载体连续流动电泳

自 60 年代以来，人们开始研究无载体连续流动电泳，又称为连续自由流动电泳。为了克服电泳产热、扩散和稳定流体问题，研制的设备均比较复杂。由英国 Harwall 的 UKAEA 实验室生化组研制的连续无载体电泳已由 Portomouth 的 CJB 发展有限公司生产，电泳仪的生产能力可达到 1g 蛋白质/min 的水平。

其原理是，含有蛋白质的溶液沿平板表面流动，形成薄的液膜，在液膜两侧放有电极，在流动液膜上形成电场。带有不同电荷的蛋白质分子在电场作用下，随着液膜向前流动的同时，又向电极方向迁移，因而形成抛物线轨迹(图 14－8)。由于蛋白质分子带有的净电荷数的差异，迁移率不同，而使它们在电场上端彼此分离，将它们分别收集就可达到分离目的。但实际上并非如此简单：导电的液体在电场内有电流通过而产生热量，使温度升高，进而改变了液流的密度；在电场内不同地方的流体密度的差异引起自然扩散或对流，使已经分离的不同组分再次混合。为解决这个问题以往主要采取以下方法。

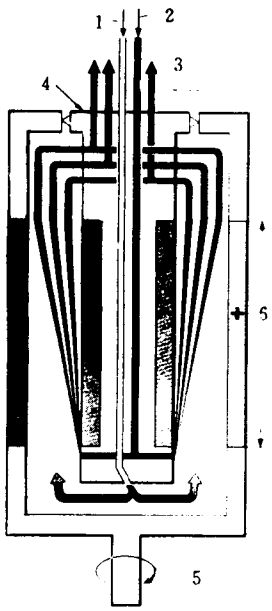


图 14－9　无载体连续流动电泳原理示意图
1—电泳缓冲液入口；　2—分离样品入口；　3—分离物出口；　4—定子；　5—转子；　6—电泳区

(1)　使用很薄的流动液膜，一般为 0.5mm。液膜的支持平板具有冷却功能。

(2) 提高液流粘度，以抑制扩散和对流。

这两种方法的缺点是电压输出低，大规模使用困难。为此采用了图 14－9 所示的新型设备。液流在两个同心圆桶电极之间的环状空隙通过，利用外圆桶电极的旋转(～150r/min)稳定自由对流，旋转使固定的内桶壁和旋转的外桶内壁之间环状电泳空隙建立一个稳定的角速度梯度。在操作时，作为电泳载体的低电导率的缓冲液通过泵连续流过环状空隙，在柱顶端由环状狭缝分流器分流成 29 份，并分别收集而达到分离目的。在无电位梯度存在的条件下，样品会沿着内壁以膜状向上移动，从柱上端出口收集到的组分主要分布于开始的几个部分中，而在施加电位梯度时，混合物中的每个组份按它们所带电荷在环状空隙的截面上迁移，形成抛物线轨迹，而由柱上端俯视时，分开的各组份如同一系列同心圆。

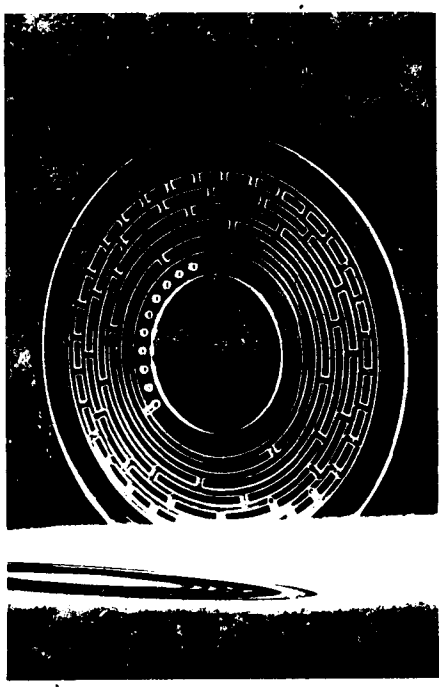


图 14－10 迷宫式平板结构图(第 10 个)

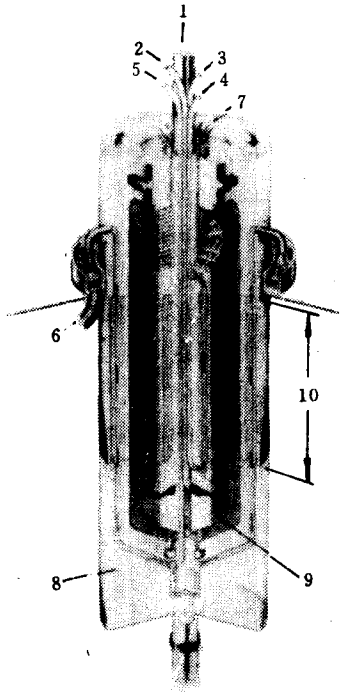


图 14－11 连续电泳仪的三维结构示意图
1—电泳缓冲液入口； 2—分离样品入口； 3—定子电极液入口； 4—定子电极液出口； 5—转子电极液入口； 6—转子电极液出口； 7—收集管； 8—转子； 9—定子； 10—电泳区

在环状空隙上部，流动的电泳缓冲液转向 90°，由迷宫式平板堆狭缝分流收集器将其分割为 29 个部分。迷宫式平板堆狭缝分割收集器由 29 个圆形平板组成，每对平板之间有狭窄的圆形槽，液体通过槽沿着象迷宫一样的通道一直到达接近中心点的出口。迷宫式平板堆确保从圆盘的周边所有点到出口处压降相同。单个迷宫式平板如图 14－10，将每个平板内槽的方位交错排列，一个一个堆积，并将内孔从上到下逐个对正，形成 29 个管道。紧靠近内桶壁液膜流由分割收集器的最下面的通道流出，而靠近它的液膜流由下一个通道流出，以此类推，环状空隙

内的液流被分割成29个部分。这个迷宫式平板堆分割收集器使3mm厚的环状液流转向90°再分割，消除了各个部分的混合。在设计时还必须考虑电泳时电极上因电解作用产生氢气和氧气的问题。为避免产生的气体在电泳缓冲液中形成气泡，环状空隙的内外壁均为半透膜，使转子和定子电极的电极液不与载体缓冲液流混合。而一次性连续流过电极的电极液可将电解产物(包括气体)从电极室内除去。电泳仪的三维结构示意图如图14－11。

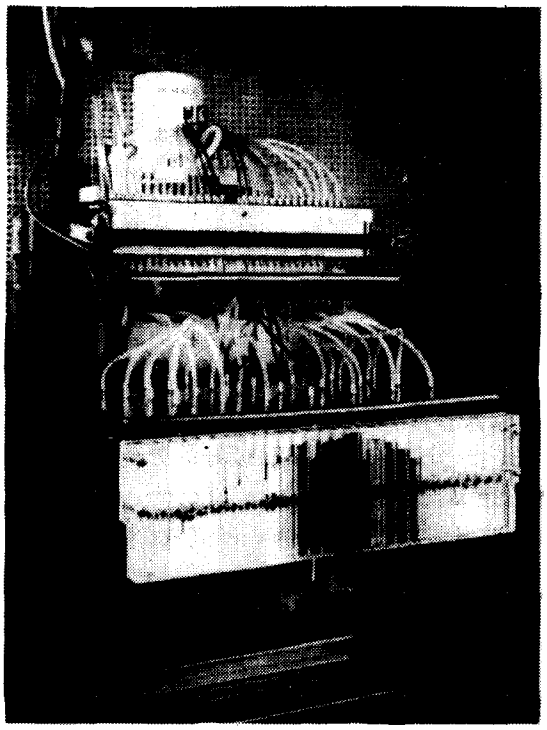


图14－12　电泳设备的全貌

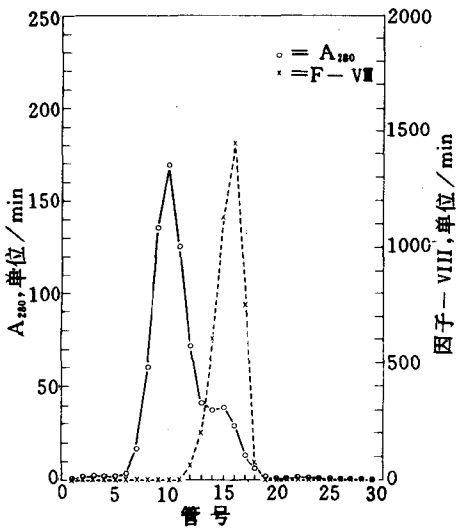


图14－13　抗嗜血因子Ⅷ等分离结果

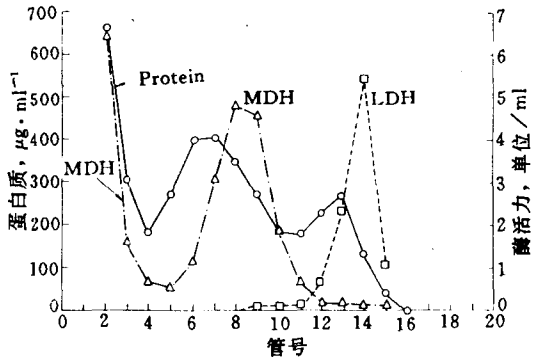


图14－14　猪心肌肉粗提取物的电泳分离结果

电泳缓冲液和电极电解质通常选用具有相同电荷的组分。电泳缓冲液从环状空隙的内定子阴极壁向外侧的转子阳极壁迁移。电泳缓冲液进入电泳仪之前预冷到 2℃左右，由于电泳产热，从出口流出时温度升到 20～25℃，这取决于使用的电流和电压。电泳样品的蛋白质浓度在 50mg/ml 以上，给样速度一般为 30ml/min，实际的生产能力为 100g/h，分辨率可以满足一般分离要求，并能保持产物的高生物活性。样品在环状空隙内的存留时间大约只有 1min。其完整设备如图 14－12。

电泳仪上的多个阀门系统均可单独调节 29 个出口中的每一个，使单一或多个分割的液流分配到两个收集系统的任何一个中。

连续无载体电泳仪可分离的物质范围很宽，从很小的分子（如染料）到特殊的生物材料（如真核细胞）均可分离。如用冷沉淀法制备的人抗嗜血因子Ⅷ制剂中仍含有大量的纤维蛋白原，它们的存在影响抗嗜血因子Ⅷ制剂的溶解度和比活。用连续无载体电泳可以进行连续分离，其结果如图 14－13，制备的抗嗜血因子Ⅷ的生物活性几乎 100%，收率在 80%以上。

连续无载体电泳也可用于粗提取物的分离纯化。图 14－14 为猪心肌肉的粗提取物的电泳结果。LDH 和 MDH 二个酶峰可以清楚地分离开，同时还可将 MDH 的同功酶分离，经两次电泳，酶活力回收也很高，达 90～100%。

连续无载体电泳的出现是电泳分离技术的重要标志，它的商品化和使用将为生物技术产物的分离纯化提供一有效的技术手段。由于它操作、分离条件温和和极好的分离效果，并能保持产物的生物活性和高的收率，因此其具有很高的工业应用价值。

电泳分离技术虽然还处于发展阶段，但从目前发展状况看，作为一种高效分离技术在生物技术产品的工业化过程中将发挥重要作用。

参考文献

1 Michael R. Ladisch, et al. Protein Purification, American Chemical Society, Washington, DC., 1990

2 Robert K. Scopes. Protein Purification (Second Edition), Springer－Verlag, London, 1987

3 A. Chrambach, et al.: Advances in Electrophorisis, Vol. 1. VCH. 1987

4 A. Chrambach, et al.: Advances in Electrophorisis, Vol. 2. VCH. 1987

5 张树政，酶制剂工业，科学出版社，1984，P. 301～335

6 Richard A. Mosher, et al.: Protein Purification: Micro to Macro, Richard, Rurgers (Ed), Alan R. Liss, Inc., New York, 1987, P. 315－328

7 C. A. Lamber,: Bioactive Microbial Products, J. D. Stowell, et al. (Ed), Academic Press, London, 1986, P. 191～209

第三篇　目标产品的分析检测及质量控制

第十五章　目标产品的蛋白质分析检测技术与质量控制

夏其昌

（中国科学院上海生物化学研究所，上海，200031）

蛋白质化学分析既是一门研究项目，也是很多学科的重要基础技术。遗传工程中下游处理和分析鉴定，大多数需要蛋白质分离分析技术。

以蛋白质一级结构测定为例，虽然有了从 cDNA 演绎蛋白质一级结构的简便快速方法，但它还不能解决一些演绎后氨基酸残基的后加工，因此还有待蛋白质分析作最后的肯定。此外，一些活性位点和结合位点的工作，目前还是依靠蛋白质分析法。

本文就作者实验室近二年来常用的现代蛋白质化学技术和基因工程产品的检测相结合，谈谈自己的一些看法，探讨并求指正。

第一节　蛋白质的纯度

遗传工程产品蛋白质的纯度是一个重要的指标，但它也是一个相对的指标，需根据实际要求而制定，纯度的要求是 95%、99%或 99.9%，正如化学试剂有化学纯、分析纯、光谱纯等。蛋白质的纯度一般指是否含有其它杂蛋白，而不包括盐、缓冲液离子、SDS 等小分子在内。蛋白质纯度如用百分数表示，有时还和检定方法、所选用仪器的参数有关。

目前常用的鉴定蛋白质纯度方法有：聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS－PAGE、毛细管电泳（CE）、等电聚焦（IEF）、HPLC（包括凝胶过滤、各种反相 HPLC、离子色谱、疏水色谱等），此外也用一些化学法，例如观察末端是否均一。鉴定蛋白质纯度的方法比较列于表 15－1。

应该指出，只用一种方法鉴定蛋白质纯度是不够的，至少应该用二种以上的方法，而且是二种不同的分离机理的方法来判断蛋白质纯度才能比较可靠。因为常常发现某一样品在凝胶过滤中是纯的，而在离子色谱中却分辨为二个组份，反之也然。又如一种样品用凝胶过滤法和 SDS－PAGE 电泳证明是纯的，但这仍不充分，因为这二种方法的机理是相同的。

在遗传工程产品的鉴定中，又常常发现 N 端是不均一的，存在着微观不均一性。例如新型 IL－2（Ser－125）的 N 端，部分是 Ala－Pro－Thr－Ser－Ser....，部分是携有 Met，故其序列是 Met－Ala－Pro－Thr－Ser....。但一般不影响其生物活性，仍认为是均一的。

表 15－1　几种鉴定蛋白质纯度方法的比较

	HPLC	SDS－PAGE IEF	CE
分离机理	极性—非极性分配；分子大小；离子交换	电荷；等电点 分子大小	电荷等
分析所需时间	10～120min	几小时	10～30min
分辨力	好	好	好
样品体积	10～50μl	1～50μl	1～50nl
灵敏度范围	纳克—微克	纳克—微克	皮克
定量准确性	＋	±	＋
检出方式	紫外，荧光，折射，电化学放射性	染色（可见或荧光），银染；放射自显影	同 HPLC
仪器价格	中—高	中—低	中—高
日常消耗	低	高	低
自动化	✓	有限	✓
人力操作	低	高	低
制备级	✓	✓	微量级制备
收集样品	✓	✓	较困难

第二节　氨基酸分析

自从 Spackman、Stein 和 Moore 建立氨基酸自动分析方法以来，无论在方法学、仪器自动化或高灵敏度方面都有了很大的发展。

氨基酸分析可以分为柱后反应法和柱前衍生法两大类。前一种方法是将游离氨基酸经过色谱柱分离后，氨基酸再与显色剂（茚三酮、荧光胺、邻苯二甲醛）作用，仪器需用专门的氨基酸分析仪或用 HPLC 加上柱后衍生装置。这种方法比较稳定，因为一些可能有影响“杂质”在柱分离过程中已与氨基酸分开，然后各自再与显色剂作用。后一种方法是把各种氨基酸和荧光试剂先作用生成氨基酸的衍生物，然后再用柱把各种衍生物分离，直接检测衍生物的荧光，这种方法的特点是灵敏度高，检出极限已达 1pmol，且可以利用 HPLC 进行氨基酸分析，譬如 OPA 技术。缺点是荧光强度依赖时间而变化，稳定性欠佳，要求控制很严格[1]。近年来报告 PITC 是一种很有效的柱前衍生技术，并且可以在 254nm 下检测，具有简便性，作者也作了一些尝试[2]。

氨基酸的水解方法通常采用 5.7mol/L HCl 真空状况下在 110℃水解 24h，也有在 150℃下快速水解 4h。不同条件下，各种氨基酸的回收会有所不同，但色氨酸遭受破坏，通常采用 3mol/L 巯基乙磺酸或 4mol/L 甲磺酸来防止色氨酸的破坏。一种新报导的方法是在水解样品中加入保护剂十二烷硫醇（Dodecanethiol）和 EDTA，据称色氨酸的回收可达 80%[3]。

最近 Stein 实验室引入气相水解法[4]，这样操作方便，样品的损失也少，回收高。目前已有把蛋白质水解、自动进样、氨基酸分析和定量报告联成一个系统的氨基酸分析仪商品出售。

在酸水解条件下半胱氨酸的定量很不准确，偏低很多。通常在酸水解蛋白质前用过甲酸氧化，把半胱氨酸氧化成磺基丙氨酸（Cysteie Acid）；或先还原蛋白质，用碘代乙酸处理把半胱氨酸转变成羧甲基半胱氨酸。一种较新的方法是把蛋白质用 DTT 还原后，加入乙烯吡啶（4－vinylpyridine）然后分析其衍生物。最近有报导用 DTDPA（3,3′－Dithiodipropionic Acid）与半胱氨酸和胱氨酸形成 Cys－MPA，此衍生物能在 HPLC 中和其它氨基酸衍生物分辨开，故可

用于准确定量半胱氨酸[5]。

如果蛋白质样品采用电泳法(例如 SDS－PAGE)分离到样品,则很难从凝胶中洗脱下来,可采用电印迹法把样品转移到 PVDF 膜上,然后在 PVDF 膜上直接进行盐酸水解和氨基酸分析,称之为原位分析(in suit)。根据美国 ABRF(Association of Biomolecular Resource Facilities)氨基酸小组的报告(1990 年),在膜上分析氨基酸的误差要比常规方法大。

人们在进行氨基酸分析时注意到了精确性和重复性,而常常忽略了其准确性。为了较好地评价氨基酸分析的准确性,过去作者用胰岛素为标准样品来判断分析方法的可靠性[1]。近来可采用"测试肽"的方法,即将 20 种常见氨基酸人工合成为一个 20 肽。然后酸水解,每种氨基酸残基出现频率都是 1,易于校正回收。

在遗传工程产品的分离鉴定中,氨基酸组成分析意义究竟有多大?鉴于目前氨基酸组成分析的水平,一般 50 个氨基酸残基的蛋白质(例如胰岛素)的定量分析是可以接近理论值的(即与序列分析结果相符)。而 100 个左右氨基酸残基的蛋白质的组成分析与理论值产生较大的偏差。分子量越大,这种情况会越严重。这主要是因为不同氨基酸的肽键在水解条件下,有些水解不完全,有些则被破坏,很难作出合适的校正。但氨基酸分析仍可提供重要的信息,例如在 γ-干扰素的氨基酸组成分析中,测定结果总是比理论值少一二十个氨基酸,特别是精氨酸少了很多,而 5/8 的精氨酸是集中在分子的 C 端附近,从而为 γ-干扰素的 C 端缺失提供了重要信息。

第三节　蛋白质浓度测定和分子量的测定

古典的蛋白质浓度的测定方法有克氏定氮法、TCA 比浊法、双缩脲法、福林-酚法和紫外法。克氏定氮法太繁琐。双缩脲法需要蛋白量较大,不够灵敏。紫外法比较方便又不损耗蛋白样品。如果某一样品已知其摩尔消光系数,则可以很准确地读数和计算出蛋白质浓度。在未知摩尔消光系数的情况下,可以简单地测定 280nm 和 260nm 光吸收值,然后用公式来计算。

$$\text{蛋白质浓度 mg/ml} = 1.55A280 - 0.76A260$$

$$\text{或 mg/ml} = 1.45A280 - 0.74A260$$

很多人也采用 A280 光吸收值为 1 时,蛋白质浓度相当于 1mg/ml 来粗略地计算,但实际上常常会产生很大的偏差。例如溶菌酶 A280 光吸收为 2.7 时,相当于 1mg/ml,而血清白蛋白仅 0.6 时即为 1mg/ml。也有用远紫外 205nm 读数为 31 时相当于 1mg/ml 或 220nm 读数为 11 时相当于 1mg/ml 来计算。

顺便指出,蛋白质达到一定纯度时,核酸量减少,故 A280/A260 比值至少达 1.5,甚至＞2.0,这与各蛋白质本来性质有关。

Lowry 方法是应用最普遍的,但它有几个不足之处,比如很多物质(特别是去垢剂)干扰测定,此外 Lowry 试剂本身稳定性欠佳,在测定过程中要求在一定浓度下和保温时间下进行。如今已涌现出一些简便和更机动灵活的方法,很受人们的欢迎。

用考马斯兰 G－250 测定蛋白质,此试剂在酸性条件下和蛋白质产生反应后,光吸收峰由 465nm 转移到 595nm,不但灵敏度高,而且测定的蛋白质浓度范围也很广,每个实验室都可以简便的配制[6]。

当然有条件用氨基酸定量的方法来测定蛋白质浓度是最可靠的,这种方法结果稍偏低些。

蛋白质分子量的测定早期采用超离心分析法和光散射方法，这需要较高级的专用仪器和较多量的蛋白质的样品，目前应用很少。

二十多年前采用凝胶过滤法测定蛋白质的分子量，应用最广泛的是 Sephadex 系列(G75、G100)等。近年来由于解决了分离介质的刚性问题，有了 HPLC 的凝胶过滤系统(例如 WATERS 的 I－60、125、250 和 Backman TSK2000SW、3000SW、4000SW)，这样测定分子量只需 1h 即可。

但在一般实验室应用的常规方法是 SDS－PAGE，它是基于在 SDS 存在下，蛋白质表面都携带了大量负电荷而呈杆状分子，在此情况下，根据其分子形状和大小来进行分离。用量约 1μg，这种方法误差约 5%～10%，但极为简便。

凝胶过滤是测定完整蛋白质分子的分子量，而 SDS－PAGE 是测定蛋白质亚基的分子量，同时用这二种方法测定同一蛋白质分子量，可以方便地判断样品蛋白质是否寡聚蛋白质。

第四节　肽　谱

肽谱技术是指蛋白质被酶解或化学降解后肽段的分离分析或制备。

一、裂解方法[7]

用酶或化学法裂解蛋白质成肽段。

理论上胰蛋白酶裂解的肽键位于碱性氨基酸(携正电荷)——精氨酸和赖氨酸的羧基端，酶解有时不完全，在此情况下，一些变性剂(4M 尿素)可加入消化液中，也可用还原剂 DTT 还原，再用烷化剂(碘代乙酸)烷化成羧甲基半胱氨酸，它能很好地和方便地进行氨基酸定量分析；硫硫键也可以在消化以后，色谱分离肽之前来破坏。

有几个酶的作用与胰蛋白酶相似，Lys－C 内肽酶只作用于 Lys(Lys－X 键)而不作用 Arg－X 键；梭菌蛋白酶只作用在 Arg－X 键上，而不作用于 Lys－X 键。而 V8 蛋白酶作用在负电性氨基酸的羧基端(Glu，Asp)，在某些条件下(pH7.8)，V8 蛋白酶只专一作用于 Glu－X 键。

化学裂解，最常用的是溴化氰，它作用于 Met 羧基端和其次一个氨基酸的肽键上，例 γ－干扰素有 4 个 Met，在溴化氰作用后可以得到 5 个肽段。

其它化学裂解法有用 BNPS－3－甲基吲哚、*N* －氯代琥珀酰亚胺等作用在 Trp－X 键上；用 2－硝基－5 硫氰基苯甲酸作用在 X－Cys 键上；羟胺作用在 Asn－Gly 键上或稀酸作用在 Asp－Pro 键上。

表 15－2　专一裂解肽键的方法

裂解剂	修饰剂/反应条件	被修饰的残基	主要裂解部位
胰蛋白酶(Trypsin)	—	—	Arg－X；Lys－X；(X≠Pro)
胰蛋白酶(Trypsin)	乙酰亚胺酸甲酯(Methyl acetimidate)	Lys	Arg－X
胰蛋白酶(Trypsin)	柠康酐(Citraconic anhydride)	Lys	Arg－X
胰蛋白酶(Trypsin)	1,2－环已二酮(1,2－Cyclohexanedione)	Arg－X	Lys－X
胰蛋白酶(Trypsin)	氮丙啶(Ethylenimine)	Cys	Arg－X；Lys－X；Cys－X

续表

裂解剂	修饰剂/反应条件	被修饰的残基	主要裂解部位
内肽酶 Lys C (Endopeptidase Lys C)	—	—	Lys－X
梭菌蛋白酶(Clostripain)	—	—	Arg－X
胰凝乳蛋白酶(Chymotrygsin)	—	—	Trp－X;Phe;Tyr－X
金黄色葡萄球菌蛋白酶 (S. protoase V8)	醋酸胺 pH4.0	—	Glu－X
金黄色葡萄球菌蛋白酶 (S. protoase V8)	磷酸缓冲液 pH7.8	—	Asp－X;Glu－X
溴化氰(CNBr)	—	—	Met－X
BNPS－3－甲基吲哚 (BNPS－Skatole)	—	—	Trp－X
N－氯代琥珀酰亚胺 [NCS(*N*－Chrosuccinimide)]	尿素	—	Trp－X
N－溴代琥珀酰亚胺 [NBS(*N*－Bromosuccinimide)]	—	—	Trp－X;Tyr－X
2－硝基－5－硫氰基苯甲酸 (2－Nitro－5－thiocyano benzoic acid)	—	—	X－Cys
羟胺(Hydroxylamine)	—	—	Asn－Gly
温和稀酸水解 (Mild acid hydrolysis)	吡啶醋酸缓冲液	—	Asp－Pro

二、肽谱分析

最早称之为 Fingerprinting(指纹术)，用在 HbA 和 HbS 的分子病研究中。即将 HbA 和 HbS 分别用胰蛋白酶酶解，然后将他们的肽分别进行纸电泳，再转动 90°进行纸层析。Ingram 用此法观察到 HbA 和 HbS 之间有一个肽斑点上的差别，进一步的肽顺序分析指出这仅仅是一个氨基酸残基(一个净电荷)的差别，正常的 HbA 中是 Glu(β－6)，异常的 HbS 中为 Val(β－6)。

技术发展到现阶段，肽谱(Peptide－Mapping)用 HPLC 和 CE 来做。HPLC 主要是用 RP－HPLC 根据肽的长短和疏水性质来分离，如果肽亲水性强，则柱不能滞留住这些亲水性强的肽段，达不到分辨开的效果；如果某些肽疏水性很强，往往会粘在柱上洗脱不下来，而 CE 有时可以避免这些弊病。

图 15－1 为用 HPLC 和 CE 做的人生长激素的酶解肽谱比较。

用 SDS－PAGE 来进行“肽谱”的分析有其局限性。用溴化氰化学裂解蛋白质时，生成的肽段较大(文献上常称为 Fragments，而不称为 Peptides)，由于肽段少，SDS－PAGE 可以根据它们的分子量不同而分辨开，但对于小分子的肽，往往无法分辨或在染色脱色过程中丢失。作者用溴化氰裂解肌红蛋白时，它的小肽(M_w 约 2512)，在 SDS－PAGE 和 Blotting 后回收仅 10% 左右(基于氨基酸顺序分析)，再小的肽则更难做好，故此法有它不足之处。同理，也不适用于酶解后肽谱的分析。

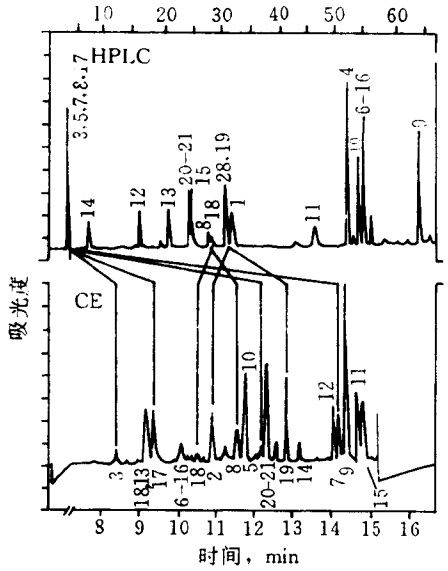


图 15－1　人生长激素(hGH)的酶解肽谱比较

色谱条件：柱：Aquapore RP－300(4.6×250mm)

流速：1ml/min

洗脱液：A：0.1%TFA；B：0.1%TFA/ACN

梯度：0%—20%B　20min

20%—25%B　20min

25%—50%B　25min

检出：214nm

毛细管电泳条件：216V/cm　20μA

缓冲液：0.01mol/L Tricine

0.045mol/L Morpholine，

0.02mol/L NaCl，pH8.0

检出：200nm

三、两种新技术

1. 微柱 HPLC

HPLC 在生命科学和分析化学中的重要性已是人所皆知的事。作者也作过介绍[8]，在此仅将微柱(Narrow bore column)HPLC 近年来在实验室中的应用作一概括介绍。

本实验室常用的微柱为 50×1mm I. D. 或 100×1mm I. D.。另一种非固定式的微柱由柱套(Holder)和柱芯(Cartridge)组成，柱芯内径 2.1mm，长度有 30mm、100mm、250mm3 种。柱芯的组成有 C18、C8、C4、C2 和 DEAE －、CM －、Amino －、Phenyl －、Cyano －、CX －、AX －、HIC － 等，可以任意置换。柱芯售价比常规的 HPLC 柱(250×4.6mm I. D.)便宜得多。

应用微柱分析或分离样品的优点是：

(1) 分辨力至少和常规 HPLC 一样[9]；

(2) 回收率高　样品在柱中填充料上的非专一性吸附比以往的柱少；

(3) 高灵敏度　由于流速一般为 100～200μl/min，出峰时间短，即峰型尖窄，从而大大提高了检测灵敏度；

(4) 消耗溶剂少　以流速 100μl/min、一个流程 1h 计算，作者分析一次样品只需 6ml 洗脱液。

通常应用微柱时要用精确输液的泵、微量流动池和更细的管道。作者实验室中则在常规的 HPLC 仪器上安置微柱，在柱前与柱后均换用更细的管道(内径 0.3mm)，并在检测器终端加上反压调节器(Beckman 公司)或采用几米长的细管道，以消除由于气泡释逸引起的噪音，取得了较好的效果。

此外，应用微柱(250×2.1mm)进行 PTH －氨基酸分析，能把全部 PTH －氨基酸分开，灵敏度为 1pmol。

图 15－2　为羧肽酶 P 的胰蛋白酶酶解肽谱。

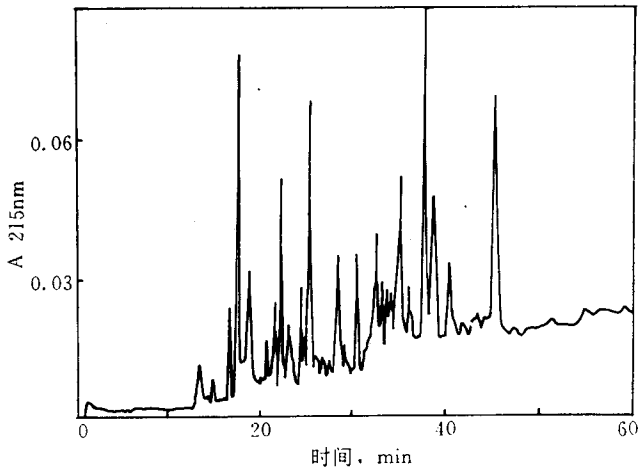


图 15－2　羧肽酶 P 的胰蛋白酶酶解肽谱

样品量：肽酸酶 P　2μg

柱：RP－18　5μl　　50mm×1mm I. D.

流速：100μl/min　　检出波长：215nm，0.1 AUFS

梯度：A：0.1%TFA；　　B：0.085% TFA－70% ACN

0－100%B　60min

2. 毛细管电泳

电泳和层析一直是研究蛋白质和多肽的重要方法。毛细管电泳除了具备凝胶电泳的高分辨力外，还以其快速、定量、重复性好、灵敏度高及自动化程度高等诸多优点在近几年内成为蛋白质、多肽乃至其它生物分子分离分析的一项崭新且重要的技术[10]。

毛细管电泳和 HPLC 比较，其理论塔板数高 20～100 倍，分辨力也高几倍，分析样品时间少 4～6 倍，且在非变性条件下进行，可用来分析蛋白质和多肽的二级三级结构差别。如与平板凝胶电泳比较，则省去了烦琐的手工操作，且定量更准确。

毛细管电泳可应用于蛋白质、多肽、核酸的结构分析和纯度鉴定以及药品食品检验、环境污染等领域。

但是，毛细管电泳仍有其不足之处，用于制备还存在不少困难。当样品较稀时不能像 HPLC 那样进样较多体积，使样品吸附在柱上，然后洗脱下来，目前也有人正在从事这方面的发展研究。因此毛细管电泳不能完全取代其它技术，只能作为一种互补的技术，扩充生物化学家和化学家的实验方法。

第五节　蛋白质一级结构和突变点的分析

天然人白细胞介素－2(IL－2)由 133 个氨基酸组成，其中有一个游离半胱氨酸(位于第 125 位)，而第 58 位和第 105 位的半胱氨酸形成硫-硫键，此硫-硫键为活性所必需，而硫-硫键的错配对，可降低其生物活性和形成抗原性。用蛋白质工程方法将 IL－2 的 125 位 Cys 改为 Ser 或 Ala，其热稳定性等方面都有较明显改善。

为了鉴定新型 IL－2 的蛋白质工程突变点，将 IL－2 用 TPCK -胰蛋白酶水解后，进行了

RP－HPLC 分析分离。为了搜寻点突变所在肽段，可以用几种方法来进行，例如：(1)天然 IL－2 和新型 IL－2 的酶解图谱比较法，寻找有差别的肽进行顺序分析；(2)荧光标记 Cys 残基，比较标记前后新型 IL－2 酶解图谱的差别，从而鉴别出点突变的肽；(3)用同位素标记法；(4)由于 IL－2 只有一个色氨酸残基，而蛋白质的 280nm 紫外吸收主要是色氨酸，其次是酪氨酸和苯丙氨酸的贡献，所以作者采用酶解后分别用 214nm 和 280nm 检测肽谱，从而非常简便地判断出含有 Trp 的肽段(残基 121－133)。分离到的肽段再经过 CE 鉴定确定为均一，最后进行了该肽的氨基酸顺序分析，证实为：

121　　125　　130　　133

Trp－Ile－Thr－Phr－Ser－Gln－Ser－Ile－Ile－Ser－Thr－Leu－Thr

从而由蛋白质化学分析方法直接证明了在新型 IL－2 中 Ser(125)确实取代了天然 IL－2 中的 Cys[11]。

第六节　蛋白质的二硫键分析

二硫键和巯基与蛋白质活性有着密切的关系。早期测定巯基用 PMCB 法，后来用 DTNB 和 NEMI，可以研究巯基分布以及与活性的关系。

遗传工程产品的硫-硫键是否正确配对，是一个重要的问题。在 IL－2 中，如果形成错配对，不但生物活性只有原来的 1/400，而且在医用后会引起不必要的麻烦。因此分析—S—S—正确配对是一项必不可少的程序。目前有以下几种方法可以借鉴。

(1) 人 IL－2 有 3 个 Cys。由天然 IL－2 的结构分析得知 Cys－58 和 Cys－105 形成硫-硫键，而 Cys－125 以游离巯基形式存在。为了阐明重组 IL－2 的硫-硫键是否以正确形式配对，在 pH8.5 下用 ^{3}H -碘代乙酸处理 IL－2，在这种情况下，仅游离的巯基才能与 ^{3}H -碘代乙酸作用形成相应的衍生物。然后再还原和用 ^{14}C -碘代乙酸烷化。因此 ^{3}H -标记仅在肽－11 上(Cys－125)，而肽－11 基本上无 ^{14}C 的放射性，而 ^{14}C -的放射性全在肽 12 和肽 14 上，因此说明 rIL－2 的硫-硫键结构和天然 IL－2 是一致的[12]。

(2) SOD 也有 3 个 Cys。一级结构分析指出 Cys－6 为游离巯基，Cys－55 和 Cys－144 形成硫-硫键。通常可用同位素标记方法来判别硫-硫键的位置，如上述方法一样。但应用同位素在国内有其不方便之处，作者采用化学修饰法来判断，用 4－Vinylpyridine 与天然的 SOD 作用，此时仅 Cys－6 和化学修饰剂形成衍生物，此衍生物在 254nm 有特殊吸收，因此在胰蛋白酶酶解后，在 254nm 下只有一个肽峰，而还原型 SOD 经同样处理，则有 3 个肽峰，经 Edman 法测 3 个肽的序列，得知肽 1 含 Cys－6，肽 2 含 Cys－55，肽 3 含 Cys－144[13]。实验结果见图 15－3。

(3) 直接分析—S—S—的异构物。IL－2 在碱性条件下可以形成—S—S—异构体(Cys－58 与 Cys－125 或 Cys－105 和 Cys－125 形成硫-硫键)，在反相色谱中，它们的疏水性弱些，较早被洗脱出柱[14]。

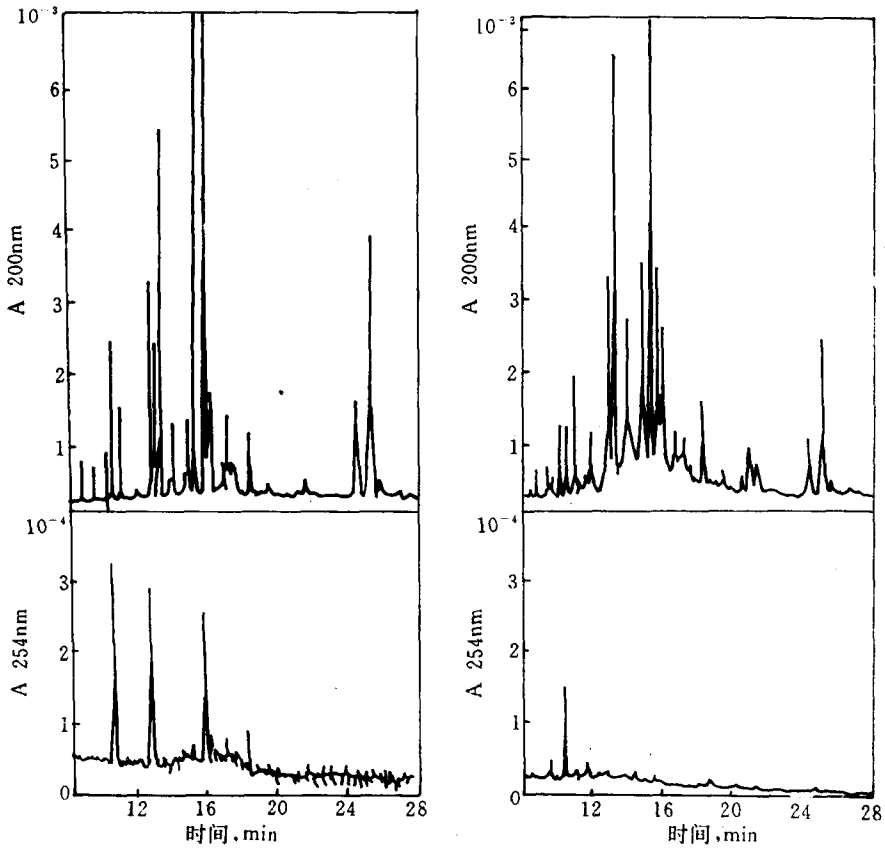


图 15－3　毛细管电泳分析识别硫-硫键和半胱氨酸的肽

电泳条件：样品浓度：1μg/μl，进样 3.5～7.0nl

缓冲液：100mmol/L PBS 10mmol/L NaCl，pH2.5

毛细管直径 50μm，长 72cm（50cm 至检出器）

电压：20kV　　电流：42μA

检出：200nm（上图）或 254nm（下图）

左图是还原型 SOD，　　右图是氧化型 SOD

第七节　蛋白质化学分析技术及新发展

在蛋白质精制纯化上，主要是层析和电泳法。

电泳方面的新发展主要是毛细管电泳和制备型等电聚焦（克级水平），但不如色谱方法成熟。

层析方面主要有 DEAE 柱层析、疏水色层等经典方法，近年来 HPLC 的应用相当有效。

电印迹（Blotting）技术也发展到了一个新水平，可以用于微量制备（1～10μg），然后可以在膜上直接进行氨基酸分析，也可以在膜上进行 BrCN 裂解和各种酶解，然后分离到肽段，并可

在膜(硝酸纤维膜、PVDF 膜、ProBlott 膜)上直接进行蛋白质顺序分析[15,16],作者也将此技术应用在工作中。

目前测定蛋白质一级结构的主要方法有:蛋白质化学方法(主要是 Edman 降解法测 N 端和用羧肽酶或化学法从 C 端测起)和从 cDNA 来演绎的方法。其它方法有质谱法和二维核磁共振法。

利用 cDNA 法测定的最长蛋白质是脱脂脂蛋白 B-100(4536 个氨基酸残基),用经典的蛋白质化学分析法测得的最大蛋白质是人凝血体系中的 Von willebrand 因子(2050 个氨基酸残基)。从蛋白质数据库来看,约一半来自 cDNA,一半来自蛋白质化学法。虽然 cDNA 技术发展很快,也方便,但目前还不能取代经典的蛋白质化学方法,例如部分顺序测定对识别蛋白质的功能结构域或蛋白质活性部位以及化学修饰部位,还是离不开经典的蛋白质化学方法。

近 2 年来作者应用了液相脉冲蛋白质/多肽自动顺序分析仪,灵敏度约 10pmol,加上微机进行数据处理和分析,既灵敏又方便。但机器有时会出现读/写错误,还是需要有经验的工作者加以最后判断才是最可靠的。

基于 DNA-顺序测定方法的启示,在蛋白质顺序测定中能否采用类似的步骤,用同位素或荧光标记蛋白质的 N 端和赖氨酸的 ε-氨基,然后部分专一性裂解成有相同分子数,但分子大小不同的肽段,被标记的肽根据分子量不同用 SDS/PAGE 分开,而后用类似 DNA 顺序的方法读"图谱"而演释出顺序,这种方法自报导后尚未见什么进展[17,18]。

C-端的测定,经典的是用羧肽酶的方法,近年来虽用 CpY、CpP,但基本方法仍是一样的。目前很多活性多肽 C-端为酰胺和生物活性有重要关系,且 cDNA 起始于 C-端,因此 C-端测序列的方法也有了新的进展。除用快原子轰击与质谱或核磁共振联用外,主要开展了用类似 N-端的化学方法(Edman 法),并在顺序分析仪上进行。近年此法已可连续分析约 10 个循环,其灵敏度在纳摩尔水平上。主要困难在产率、重复效率等不够理想,尚有待进一步发展[19,20]。

第八节 其 它

在美国,FDA 很明确表示,在遗传工程产品生产过程中不允许有 SDS 参与;而在国内都一直是一个悬而未决的问题。SDS 与蛋白质要形成复合物,且结合量与蛋白质的性质和 SDS 的浓度有关。一旦形成复合物后,其空间结构与原来蛋白质已大不相同,这些早已由平衡透析法 ORD 谱学研究所证实。

在作者的工作中观察到蛋白质结合上 SDS 后 PI 产生变化;除去 SDS 后一些蛋白质的 PI 不能恢复;而 α 螺旋和—S—S—键含量高的样品 PI 可以恢复,可能是因为它们本来的构象变化不大。文献报导有些蛋白质透析除去 SDS 后,仍是一种不同于原来蛋白质的构象[21],更显示出遗传产品中加入过 SDS 的严峻性。虽然采用了很多方法除去 SDS,但用什么方法才能定量证实加入的 SDS 已除尽,却是一个问题。

在作者的工作中观察到,SDS 处理过的 IL-2 疏水性增加,在 HPLC 色谱行为上与未经 SDS 处理过的 IL-2(Hoffman-La Roche 产品)显然不同,可能反映出它们在构象上有所不同。

二硫键正确配对方面:

二硫键异构酶有利于二硫键的正确配对[22],邹承鲁实验室已报导此酶能使错配对的胰岛

素形成正确配对的胰岛素分子。近年来报导了Chaperone能促进蛋白质的折叠和装配[23,24]，它先紧紧结合到未折叠的蛋白质上，然后释放它们成折叠状，同时消耗100分子ATP。这些信息对硫-硫键正确配对是有用的，但问题在于同时又引入了一个新的蛋白质。是否能把这些蛋白质固定化后用于解决二硫键的正确配对？不妨一试。

参考文献

1 夏其昌等．生物化学与生物物理学报．1985，17：747
2 夏其昌，吴高德．生物化学与生物物理学报．1989，21：465
3 Bozzini，M. et al.，ABI Research News. Feb. 1991
4 Meltzer，N. M. et al.，Anal. Biochem.，1987，160：365
5 Barkholt，V，and Jensen，A. L. Anal. Biochem.，1989，177：318
6 Bradbord，M. Anal. Biochem.，1976，72：248
7 Allen，G. Sequencing of Proteins and Preptides，Elsevier Science Pubishers B. V. 1989
8 夏其昌．蛋白质和酶学研究方法．p. 77～98，科学出版社．1989
9 夏其昌，屠红旻．生命化学．1990，10：34
10 屠红旻，夏其昌．化学通报．1991，12期，15页
11 吴高德等．生物工程学报(印刷中)
12 Jones，B. N. and Stein，S.，in "Fundamentals of Protein Biotechnology"，Marcel Dekken Inc. 1990，p. 181.
13 屠红旻，夏其昌．生物化学杂志．1992，8:663
14 Browing J. L. et al.，Anal Biochem.，1986，155:123
15 Matsudaira，P. J. Biol. Chem.，1987，262：10035
16 Yuen，S. W. et al.，J. Protein Chem.，1990，9:267
17 Jue，R. S. & Doolittle，R. F. Biochemistry 1985，24:162
18 Jay，D. G. J. Biol. Chem.，1984，259:15572
19 Hawke，D. H. et al.，in "Technique in Protein Chemistry"，Academic Press，1989，p. 59
20 Inglis，A. S et al.，in "Methods in Protein Sequence Analysis"，Birkhansen Verlag，1990，p. 23
21 Visser，L. & Blout，R. Biochemistry，1971，10:743
22 唐建国．生物化学与生物物理进展．1991，18:173
23 Creighton T. E. Nature，1991，352，17
24 Martin J. et al.，Nature，1991，352：36